

Université de Sherbrooke

Rôle du facteur de transcription GATA4 dans l'épithélium intestinal et identification
d'une nouvelle cible, le gène PAPI (Pancreatitis Associated Protein I)

Par
Geneviève Brouillard
Département d'anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
maître ès en sciences (M.Sc.)
en biologie cellulaire

Mémoire évalué par :

Dr François Boudreau, programme de biologie cellulaire

Dr Fernand-Pierre Gendron, programme de biologie cellulaire

Dr Simon Labbé, Département de biochimie, Université de Sherbrooke

Août 2008



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-49468-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-49468-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Table des matières

LISTE DES ILLUSTRATIONS	VII
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	IX
LISTE DES COMMUNICATIONS	XVI
RÉSUMÉ	XVII
INTRODUCTION	1
1. ANATOMIE DU TUBE DIGESTIF	1
1.1. L'INTESTIN GRÊLE	4
1.2. CÔLON	6
2. ÉPITHÉLIUMS DIGESTIFS	6
2.1. ÉPITHÉLIUM INTESTINAL GRÊLE	7
2.2. ÉPITHÉLIUM INTESTINAL COLIQUE	10
2.3. MODÈLES CELLULAIRES	11
2.3.1. Cellules IEC-6 et IEC-6/Cdx2	13
2.3.2. Cellules Caco-2/15	13
2.3.3. Co-culture mésenchyme-épithélium	15
3. FACTEUR DE TRANSCRIPTION GATA4	15
3.1. GÉNÉRALITÉS	15
3.2. DOMAINES DE LA PROTÉINE GATA4	17
3.3. ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE GATA4	20

3.4. FONCTIONS DE GATA4 AU NIVEAU INTESTINAL	21
4. MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN (MII)	24
5. LA PROTÉINE PAP	29
5.1. ORIGINE	29
5.2. GÉNÉRALITÉS	30
5.3. IMPLICATIONS/FONCTIONS DE PAP	31
5.3.1. Au niveau intestinal	32
6. PROBLÉMATIQUE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS	34

MATÉRIEL ET MÉTHODES	36
-----------------------------	-----------

1. CULTURE CELLULAIRE	36
1.1. LES CELLULES 293T ET CACO-2/15	36
1.2. LES CELLULES IEC-6 ET IEC-6/Cdx2	36
1.3. LA CO-CULTURE MÉSENCHYME-ÉPITHÉLIUM	37
2. INDUCTION D'UN STRESS INFLAMMATOIRE CELLULAIRE	37
2.1. DANS LES CELLULES IEC-6	37
2.2. DANS LES CELLULES IEC-6/Cdx2	38
3. LIGNÉES CELLULAIRES IEC-6/Cdx2 SHGATA4	39
3.1. CLONAGE SHRNA DANS LE VECTEUR PLENTIV5U6	39
3.1.1. Purification des oligonucléotides sur gel d'acrylamide	39
3.1.2. Hybridation des oligonucléotides purifiés	41
3.1.3. Préparation du vecteur, ligation et transformation	41
3.2. PRODUCTION DES LENTIVIRUS	42

3.2.1.	Préparation des ADNs et transfection	42
3.2.2.	Récolte des virus	43
3.3.	INFECTION DES CELLULES IEC-6/Cdx2	43
4.	ISOLEMENT DES PROTÉINES ET ANALYSE WESTERN	44
4.1.	EXTRACTION DE PROTÉINES TOTALES DE CELLULES	44
4.2.	EXTRACTION DE PROTÉINES TOTALES DE TISSUS INTESTINAUX MURINS	44
4.3.	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN	45
4.3.1.	Préparation des échantillons de protéines, migration et transfert	45
4.3.2.	Immunodétection des antigènes	45
5.	EXTRACTION D'ARN TOTAL ET ANALYSE PAR PCR ET Q-PCR	46
5.1.	EXTRACTION D'ARN TOTAUX DE CELLULES ET DE TISSUS	46
5.2.	RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE AVEC LA TRANSCRIPTASE INVERSE (RT-PCR)	47
5.3.	PCR QUANTITATIF EN TEMPS RÉEL (Q-PCR)	48
6.	ANALYSE PAR MICRO-PUCES À L'ADN (AFFYMETRIX)	50
7.	CLONAGE PBABEPURO/MUTG4	51
7.1.	MUTAGÉNÈSE PAR PCR DU cDNA DE GATA4	51
7.2.	SOUS-CLONAGE DU cDNA GATA4 MUTÉ DANS LE VECTEUR DE TRANSITION TOPO ET TRANSFERT DANS LE VECTEUR PBABEPURO	52
7.3.	EXPÉRIENCE DE « RÉCUPÉRATION » DE GATA4	53
8.	ACTIVITÉ DE LIAISON DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION GATA4 AU PROMOTEUR DU GÈNE PAPI	53
8.1.	PRODUCTION DE PROTÉINES GATA4 <i>IN CELLULO</i>	53
8.2.	EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES DES CELLULES	53
8.3.	PRÉPARATION DES OLIGONUCLÉOTIDES POUR LES SONDAS RADIOACTIVES	54
8.4.	RÉACTION DE LIAISON À L'ADN ET GEL DE RÉTENTION	55
		III

9. PRÉPARATION DES CONSTRUCTIONS PGL3 BASIC/PROMOTEUR PAPI	56
9.1. EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE DES CELLULES IEC-6 ET RÉACTION PCR	56
9.2. SOUS-CLONAGE DE LA RÉGION PROMOTRICE DE PAPI DANS LE VECTEUR DE TRANSITION TOPO	57
9.3. AMPLIFICATION DES DIFFÉRENTS FRAGMENTS DU PROMOTEUR DU GÈNE PAPI	57
9.4. CLONAGE DES FRAGMENTS AMPLIFIÉS DU PROMOTEUR DU GÈNE PAPI DANS LE VECTEUR LUCIFÉRASE PGL3BASIC	59
10. ESSAIS LUCIFÉRASES	59
10.1. PRÉPARATION DES CELLULES	59
10.2. TRANSFECTION TRANSITOIRE	60
10.2.1. Préparation des ADNs	60
10.2.2. La transfection	60
10.3. LYSE DES CELLULES ET ESSAI LUCIFÉRASE	60
11. GÉNÉRATION MODÈLE MURIN D'EXPRESSION ECTOPIQUE DE GATA4	61
11.1. CLONAGE DE LA CONSTRUCTION CMV-LOXP.STOP.LOXP-GATA4	63
11.1.1. Sous-clonage de la cassette loxP.STOP.loxP dans le vecteur de transition TOPO et transfert dans le vecteur plenti5V5adaptateur/GATA4	63
11.2. VALIDITÉ DE LA CONSTRUCTION CMV-LOXP.STOP.LOXP-GATA4	65
11.3. GÉNÉRATION DE SOURIS TRANSGÉNIQUES LOXP.STOP.LOXP-GATA4 ET CROISEMENTS AVEC LES SOURIS VILCRE	65
11.4. GÉNOTYPAGE	67
11.4.1. Par PCR	67
11.4.2. Par Southern	69

RÉSULTATS

1. INTERFÉRENCE À L'ARN POUR GATA4	74
2. IDENTIFICATION DE NOUVELLES CIBLES POTENTIELLES DE GATA4	78
3. DÉPENDANCE DE L'EXPRESSION DU GÈNE PAPI EN FONCTION DE GATA4	82
4. ANALYSE DU PROMOTEUR PAPI DE RAT	85
5. ANALYSE DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DE GATA4 SUR LE PROMOTEUR PAPI DE RAT	89
6. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE PAPI ET GATA4 EN CULTURE CELLULAIRE SOUS STRESS INFLAMMATOIRE	96
7. MODÈLE MURIN TRANSGÉNIQUE D'EXPRESSION ECTOPIQUE DE GATA4	99

DISCUSSION

1. IMPLICATION DE GATA4 DANS LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	104
2. PAPI, UNE NOUVELLE CIBLE GÉNÉTIQUE DE GATA4	106
2.1. <i>IN VITRO</i> , GATA4 PEUT LIER LE PROMOTEUR DU GÈNE PAPI	109
2.2. GATA4 ACTIVE LA TRANSCRIPTION DU GÈNE PAPI	110
2.3. CDX2 EST UN PARTENAIRE DE GATA4 DANS L'ACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE DU PROMOTEUR PAPI	111
2.4. ÉLÉMENT RÉPRESSEUR PRÉSENT SUR LE PROMOTEUR DU GÈNE PAPI	112
2.5. IMPLICATION DU DUO GATA4-PAPI DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE À UN STRESS INFLAMMATOIRE	113
3. LE MODÈLE MURIN DOUBLE TRANSGÉNIQUE (LOXP.STOP.LOXP-GATA4 / CRE) ET L'EXPRESSION ECTOPIQUE DE GATA4	116

CONCLUSION	121
PERSPECTIVES	123
REMERCIEMENTS	126
LISTE DES RÉFÉRENCES	128

Liste des illustrations

Figures

Figure 1. Structure de la paroi du tube digestif	3
Figure 2. Surface d'échange de l'intestin grêle	5
Figure 3. Structure et cellules de l'épithélium intestinal grêle	9
Figure 4. Structure et cellules de l'épithélium colique	12
Figure 5. La protéine murine Gata4	18
Figure 6. Pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin	27
Figure 7. Voies communes d'activation cellulaire des MII	28
Figure 8. Établissement de l'outil shRNA(GATA4)	40
Figure 9. Modèle murin transgénique d'expression ectopique de GATA4	62
Figure 10. Diminution de l'expression de GATA4 dans les cellules IEC-6/Cdx2 shRNA(GATA4)	76
Figure 11. Expression de GATA4, Cdx2 et PPAR γ dans différentes conditions de cultures à long terme des cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4	77
Figure 12. Analyse Affymetrix comparative entre les conditions de culture plenti vide et shGATA4 #3 dans les cellules IEC-6/Cdx2	79
Figure 13. Validation des cibles PAPIII et PAPI dans une cinétique de culture de cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4 à long terme	80
Figure 14. Analyse quantitative de l'expression du gène PAPI dans des cinétiques de culture de cellules IEC-6/Cdx2 à long terme	81
Figure 15. Réversibilité de l'expression de GATA4	83
Figure 16. Analyse du promoteur du gène PAPI de rat	87
Figure 17. Analyse des huit sites potentiels GATA sur le promoteur du gène PAPI de rat par gel de rétention	88

Figure 18. Schéma des différentes constructions du promoteur du gène PAPI utilisées dans les essais transcriptionnels	90
Figure 19. GATA4 et Cdx2 activent la transcription du promoteur PAPI	93
Figure 20. GATA4 et Cdx2 régulent différemment la transcription du promoteur PAPI selon la région promotrice analysée	94
Figure 21. GATA4 et Cdx2 activent de façon synergique la transcription du petit promoteur PAPI	95
Figure 22. Expression de PAPI et GATA4 sous stress inflammatoire	98
Figure 23. Validation de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4	101
Figure 24. Identification des souris positives loxP.STOP.loxP-GATA4	102
Figure 25. Analyse des souris doubles transgéniques loxP.STOP.loxP-GATA4 / Cre	103

Tableaux

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés lors de l'analyse des protéines par transfert western	46
Tableau 2 : Amorces et amplification de gènes cibles de rat par RT-PCR	48
Tableau 3 : Amorces et amplification des gènes cibles par Q-PCR	49
Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le gel de rétention	55
Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification des 5 fragments du promoteur PAPI	58
Tableau 6 : Amorces et amplification des gènes cibles murins par RT-PCR	67
Tableau 7 : Génotypage par PCR, amorces et conditions d'amplification	69

Liste des symboles et abréviations

a.a.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Arg	Arginine (a.a.)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>bovine serum albumine</i>)
CD	Maladie de Crohn
CDP	CCAAT displacement protein
Cdx	Caudal related homeobox gene
ChiP	Immunoprécipitation de la chromatine
CMV	Promoteur du cytomégalovirus
Cre	Cyclization recombinase (bactériophage P)
C-term	Domaine C-terminal
Cys	Cystéine (a.a.)
DEPC	Diéthyle pyrocarbonate

DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate (N = A, T, C, G)
DTT	Dithiothréitol
E	Jour embryonnaire (ex. : E8,0 = jour embryonnaire 8,0)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EtOH	Éthanol
FABP	Fatty acid binding protein
FBS	Sérum bovin fœtal
FOG-2	Friend of GATA-2
Gata4	Protéine murine
<i>Gata4</i>	Gène murin
GATA4	Protéine humaine
<i>GATA4</i>	Gène humain
GPX 2	Glutathione peroxydase 2
h	Heure

HEPES	4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonate
HIP	Hepatocarcinoma-intestine-pancreas
HNF	Hepatocyte nuclear factor
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IEC	Intestinal Epithelial Cell
IFABP	Intestinal fatty acid binding protein
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleukine
Ile	Isoleucine (a.a.)
JAK/STAT	Janus kinase (JAKs) / Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs)
kDa	Kilodaltons
lenti	Lentivirus
LITA	Lithostathine
loxP	locus of X-ing over P1
LPH	Lactase-phlorizin hydrolase

LPS	Lipopolysaccharide
LTR	Long terminal repeat
mA	milliampères
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MII	Maladies Inflammatoires de l'Intestin
ml	millilitre
mm	millimètre
mutG4	Protéine GATA4 mutée et non reconnue par le shGATA4 #3
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NaF	Fluorure de sodium
NCAM-1	Neural cell adhesion molecule 1
NFκB	Nuclear factor kappa B
ng	nanogramme
NLS	Nuclear localisation sequence
nm	nanomètre
NO	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique

NOD2/CARD15	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) / caspase recruitment domain family, member 15 (CARD15)
N-term	Domaine N-terminal
O/N	Over night (durant la nuit)
PAP	Pancreatitis Associated Protein
pb	paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PKA	Protéine kinase A
PLB	Tampon de lyse passive (<i>passive lysis buffer</i>)
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Q-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (<i>Quantitative-Polymerase Chain Reaction</i>)
rétro	Rétrovirus
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference

RNA Pol III	RNA polymérase III
RNase	Ribonucléase
ROM/ROS	Reactive oxygen metabolite/species
rpm	révolution par minute
RT-PCR	Transcription inverse et Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Reverse transcriptase and Polymerase Chain Reaction</i>)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	Sérine (a.a.)
shRNA	short/small-hairpin ribonucleic acid
SI	Sucrase-isomaltase
TAD	Transcriptional activation domain
TBE	Tris borate EDTA
TBP	TATA binding protein
TEMED	NNN'N'-tétraméthyléthylène diamine
TLR	Toll-like receptor
Tm	Température d'hybridation des amorces (PCR)
TNF	Tumor necrosis factor

TP	Température pièce
UC	Colite ulcéreuse
µg	microgramme

Liste des communications

1. Brouillard, G., Boudreau, F. 2008. Le modulateur de l'inflammation intestinale PAPI est une cible du facteur de transcription GATA4. 37^e édition de la Journée Scientifique de la Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec (présentation d'une affiche).
2. Brouillard, G., Babeu, J.P., Boudreau, F., Lévy, É. 2007. L'utilisation des souris modifiées génétiquement dans la compréhension des maladies intestinales. Journée de la recherche 2007, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec (présentation d'une affiche).
3. Brouillard, G., Boudreau, F. 2006. Le gène Pancreatitis Associated Protein I (PAPI), une cible du facteur de transcription GATA4 impliqué dans la physiologie intestinale. 48^e Réunion annuelle du CRCQ, Lac-à-l'Eau-Claire, Québec (présentation orale).
4. Brouillard, G., Boudreau, F. 2005. Rôle du facteur de transcription GATA-4 dans la différenciation épithéliale intestinale. 73^e Congrès annuel de l'ACFAS, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec (présentation orale).

Résumé

Rôle du facteur de transcription GATA4 dans l'épithélium intestinal et identification d'une nouvelle cible, le gène PAPI (Pancreatitis Associated Protein I)

Geneviève Brouillard, Département d'anatomie et biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke.

Le facteur de transcription GATA4 fait partie de la famille des facteurs GATA comprenant 6 membres (GATA1 à 6). GATA4 possède deux doigts de zinc qui lui permettent la liaison à l'ADN sur le motif consensus (A/T)GATA(A/G). Ce facteur est exprimé dans plusieurs organes tels que le cœur, le foie, les poumons, les gonades et l'intestin grêle. À cet effet, au niveau intestinal, c'est le membre GATA qui est le plus exprimé. Il se retrouve dans les cellules différenciées de l'épithélium intestinal, de façon décroissante le long de l'axe céphalo-caudal, où il agit comme régulateur important de plusieurs gènes spécifiques. Il régule, entre autres, la transcription des gènes marqueurs de la différenciation que sont la sucrase-isomaltase et la lactase, et ce, en collaboration avec des partenaires d'interaction tels que Cdx2 et HNF-1 α . En plus, GATA4 serait essentiel au maintien de l'identité des cellules jéjunales différenciées.

Notre hypothèse de départ était donc que cette protéine pourrait être impliquée dans le processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales. De ce fait, notre objectif fut d'approfondir la fonction de GATA-4 en identifiant de nouveaux gènes

cibles de ce facteur de transcription au niveau de l'épithélium intestinal. Pour ce faire, une approche par interférence à l'ARN (shGATA4) fut utilisée pour réduire l'expression de GATA-4 dans les cellules IEC-6/Cdx2 utilisées comme modèle de cellules épithéliales intestinales différenciées. Par la suite, une étude différentielle par criblage de micropuces à ADN a été effectuée sur des cultures à court terme pour identifier des cibles potentiellement directes de GATA-4. Les résultats obtenus n'ont ciblé aucun gène impliqué dans la différenciation cellulaire. Cependant, une des cibles prédites avec une modulation à la baisse fut le produit du gène PAPI (Pancreatitis associated protein I).

L'expression de PAPI est connue pour être augmentée en situation d'inflammation intestinale chez des patients atteints de MII (maladie de Crohn et colite ulcéreuse). PAPI est en fait une protéine antimicrobienne qui s'attaque aux bactéries Gram positives. Cette protéine est également impliquée dans la modulation de la réponse inflammatoire, en diminuant la sécrétion de cytokines proinflammatoires dans les cas de MII. Toutefois, la régulation de ce gène est jusqu'à ce jour inconnue.

La validation par Q-PCR des données obtenues, a démontré une forte réduction de PAPI spécifiquement dans les lignées IEC-6/Cdx2 shGATA-4 tout au long du processus de différenciation. Une analyse informatique du promoteur PAPI a mené à l'identification de huit sites potentiels d'interaction pour GATA-4, ainsi que quatre sites pour HNF-1 α et un site pour Cdx2. Cinq des sites GATA ont montré une forte capacité d'interaction *in vitro* par EMSA. Aussi, une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène PAPI par GATA4, de façon dose dépendante, a été démontrée par essai luciférase. Des essais transcriptionnels ont également permis

de démontrer un effet synergique entre GATA4 et Cdx2 sur l'activation de ce promoteur. Finalement, le traitement des cellules épithéliales avec des modulateurs de la réponse inflammatoire (LPS, TNF) a révélé une modulation positive de GATA-4 et de PAPI. Enfin, la création d'un modèle de souris transgénique d'expression ectopique de GATA4 au niveau de l'épithélium intestinal et colique a été tentée. La validation de ce modèle reste à être complétée.

En conclusion, le facteur de transcription GATA4 semble être un régulateur direct du gène PAPI et pourrait être impliqué dans la signalisation inflammatoire de la cellule épithéliale intestinale.

Introduction

1. Anatomie du tube digestif

Le tube digestif s'étend depuis la cavité buccale jusqu'à l'anus et présente des variations de structure permettant d'effectuer ses différentes fonctions. La cavité buccale reçoit la nourriture qui, après le processus de mastication et la formation du bol alimentaire, gagne l'œsophage et l'estomac. La digestion gastrique se solde par la formation du chyme, acide, qui parvient en petites quantités dans l'intestin grêle où a lieu la plus grande partie de la digestion et de l'absorption. Le résidu liquide gagne le côlon où la digestion est achevée et où l'eau et les sels sont réabsorbés. Les fèces solides sont ensuite éliminées par l'anus (GARTNER et HIATT, 2004).

Le tube digestif présente le même type d'organisation de ses structures depuis l'œsophage jusqu'à l'anus : sa paroi est constituée de quatre tuniques concentriques (GARTNER et HIATT, 2004; FAWCETT et al, 2002) (Fig. 1).

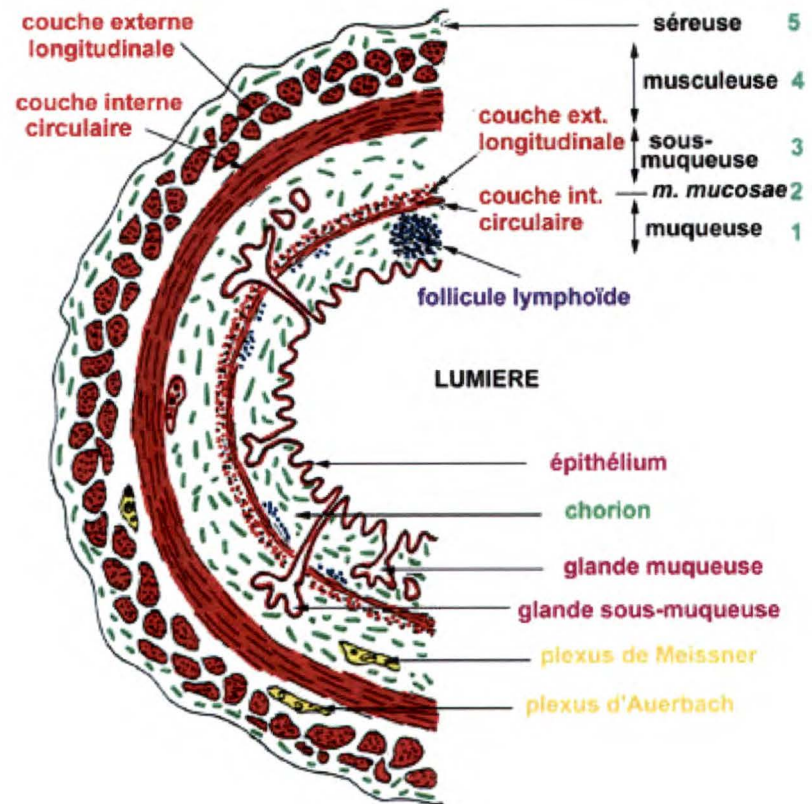
La tunique la plus interne, qui est directement en contact avec la lumière, est la **muqueuse**, elle-même composée de trois couches concentriques : 1) un épithélium bordant la lumière et ayant des propriétés sécrétrices et d'absorption appropriées à la fonction du segment concerné, 2) un chorion mince (ou lamina propria) sous l'épithélium, comprenant un tissu conjonctif très vascularisé contenant des macrophages, des plasmocytes et des lymphocytes, spécialisés dans la défense

immunologique contre la flore bactérienne intra-luminale et 3) une musculaire muqueuse composée d'une couche de cellules musculaires lisses capable de modifier la configuration de surface de la muqueuse (GARTNER et HIATT, 2004; FAWCETT et al, 2002).

La **sous-muqueuse** est une couche de tissu conjonctif plus dense qui a un rôle de soutien mécanique de la muqueuse. Cette couche contient également la plus grande partie des vaisseaux sanguins alimentant la muqueuse et un réseau de nerfs sympathiques, le plexus de Meissner. Celui-ci commande la motilité intrinsèque du tube digestif. On y retrouve aussi des nodules lymphoïdes éparpillés impliqués dans la défense immunologique de la muqueuse, les plaques de Peyer (GARTNER et HIATT, 2004; FAWCETT et al, 2002).

La **musculeuse** est composée habituellement d'une couche musculaire lisse circulaire interne et d'une couche musculaire lisse longitudinale externe. Les plexus vasculaires et nerveux myentérique (plexus d'Auerbach) sont localisés entre les deux couches. La musculeuse a pour fonction le malaxage et la propulsion du contenu digestif le long du tube digestif par péristaltisme (GARTNER et HIATT, 2004).

La tunique la plus externe de la paroi du tube digestif est soit une **séreuse**, soit une **adventice**. Les régions intrapéritonéales du tube digestif, c'est-à-dire celles qui sont suspendues dans la cavité abdominale par le péritoine, possèdent une séreuse. Celle-ci est constituée par un tissu conjonctif recouvert d'un mésothélium (épithélium pavimenteux simple) qui diminue les forces de frottement au cours de la digestion.



D'autres régions du tube digestif sont solidement fixées aux structures voisines par des fibres conjonctives : elles possèdent une adventice (GARTNER et HIATT, 2004).

1.1. L'intestin grêle

L'intestin grêle est un tube replié sur lui-même, divisé, pour des raisons pratiques de description, en trois segments reconnaissables par des différences dans la structure microscopique de leur muqueuse. Le segment initial, le **duodénum**, est fermement attaché à la paroi postérieure de l'abdomen. Il a un trajet en C autour de la tête du pancréas. À son extrémité distale, il est en continuité avec le **jéjunum**, qui est suspendu à la paroi postérieure de l'abdomen par le mésentère. Le jéjunum, représente environ les deux cinquièmes de la longueur totale de l'intestin grêle, il est suivi par l'**iléon** qui en représente les trois cinquièmes distaux. La transition entre les trois segments est progressive (FAWCETT et al, 2002).

L'absorption efficace des nutriments, est favorisée par plusieurs dispositifs qui augmentent la surface totale de la muqueuse (Fig. 2a). Le premier de ceux-ci est la grande **longueur** de l'organe. Le dispositif suivant d'accroissement de la surface, les **valvules conniventes** (valvules de Kerckring), sont les plis orientés transversalement de la muqueuse et de la sous-muqueuse qui se projettent dans la lumière et qui sont nettement visibles à l'œil nu (Fig. 2b). Elles ralentissent le passage du contenu intestinal et augmentent la surface de la muqueuse d'environ trois fois. Un autre dispositif d'augmentation de la surface est la présence d'innombrables **villosités** intestinales (Fig. 2c), qui réalisent une augmentation de la surface d'environ huit fois. Finalement, l'épithélium recouvrant les villosités intestinales contient des cellules

Figure 2. Surface d'échange de l'intestin grêle

A) Facteurs d'augmentation de la surface d'échange. La digestion et l'absorption sont favorisées par l'amplification considérable de la surface d'échange grâce aux :

- **anses intestinales,**
- **valvules conniventes ou valvules de Kerckring,**
- **villosités intestinales et**
- **microvillosités.**

(Figure tirée du site internet :

<http://www-rocq.inria.fr/who/Marc.Thiriet/Glosr/Bio/TubDigest/index.html>)

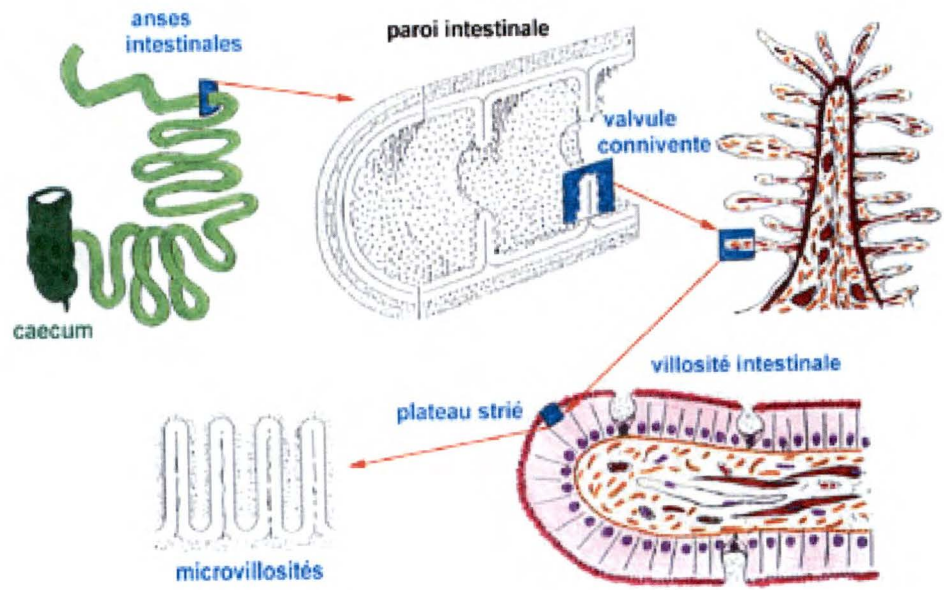
B) Valvules conniventes. Coupe du jéjunum mettant en évidence les valvules conniventes (ou plis circulaires).

C) Villosités. Photographie de microscopie optique montrant trois villosités du duodénum.

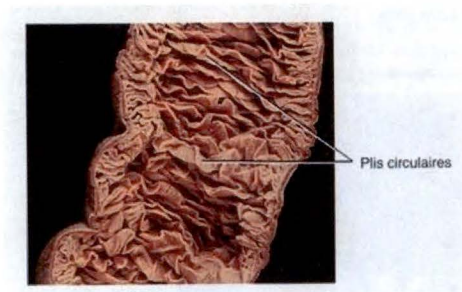
D) Microvillosités. Photographie de microscopie électronique montrant des microvillosités de cellules absorbantes (ou entérocytes) du duodénum.

(B-C-D, figures tirées du livre : Principes d'Anatomie et de Physiologie (TORTORA et al, 2001))

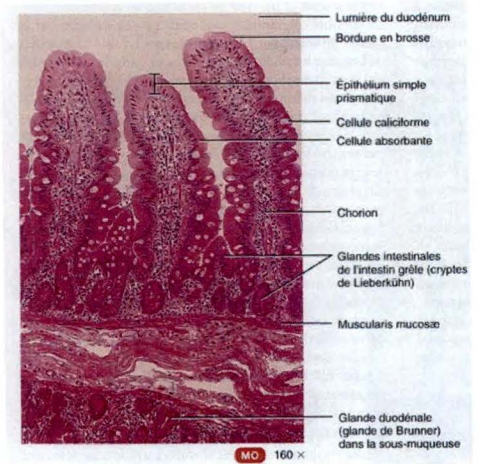
A



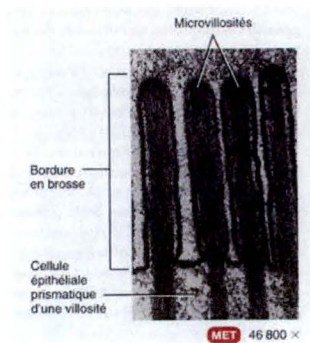
B



C



D



cylindriques hautes avec un plateau strié (bordure en brosse) constitué de plus de 3 000 **microvillosités** par cellule, fournissant une augmentation supplémentaire de trois fois la surface (Fig. 2d) (FAWCETT et al, 2002)

1.2. Côlon

Comparativement à l'intestin grêle, le côlon est plus court, il a un diamètre plus grand et il est également davantage fixé à la cavité abdominale (TORTORA et al, 2001). Différents termes descriptifs sont donnés à ses segments successifs : cæcum, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde, rectum et anus. Ces termes sont plus utiles à l'anatomiste qu'à l'histologie, car la structure microscopique du côlon est à peu près la même sur toute sa longueur. Sa surface luminale est dépourvue de tout repli, contrairement aux valvules conniventes de l'intestin grêle. Il n'existe pas de villosité et sa surface est presque lisse (FAWCETT et al, 2002). Le côlon a pour fonction d'absorber les acides aminés, les lipides et les glucides encore présents dans la lumière, ainsi que, de façon principale, l'eau, les électrolytes et certaines vitamines, et de concentrer les fèces (GARTNER et HIATT, 2004).

2. Épithéliums digestifs

Une première fonction des épithéliums digestifs est de former une barrière protectrice entre le milieu extérieur, représenté par le contenu de la lumière digestive, et le milieu intérieur (SCOAZEC, 2005). Cette barrière est à la fois physique, chimique et immunitaire : physique, grâce à la cohésion des cellules épithéliales assurées par les jonctions serrées et à leurs interactions avec le tissu conjonctif sous-jacent ; chimique,

grâce à la sécrétion de mucus et de substances défensives et protectrices ; immunitaire, grâce à la participation des cellules épithéliales à l'immunité innée et à leurs interactions avec le système lymphoïde annexé au tube digestif (SCOAZEC, 2005).

Les épithéliums digestifs sont également impliqués de manière directe dans le processus de digestion. Ils facilitent la progression du bol alimentaire, notamment par la sécrétion du mucus, qui lubrifie la paroi digestive. Ils participent à la dégradation des aliments en sécrétant dans la lumière digestive de nombreuses enzymes, comme la sucrase-isomaltase, la lactase, la lipase gastrique, etc. Ils jouent un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments, permettant le passage de ceux-ci, à travers les cellules épithéliales, de la lumière intestinale vers les vaisseaux sanguins et lymphatiques sous-jacents. Aussi, ils participent à la phase d'élimination des déchets en contrôlant les flux hydroélectrolytiques entre le milieu intérieur et la lumière digestive. Enfin, les épithéliums digestifs contribuent à la régulation de l'ensemble des fonctions du tube digestif, notamment grâce à leur composante endocrine, capable de sécréter plusieurs dizaines de peptides différents, tels que la gastrine, la sécrétine et la cholécystokinine (CCK) (SCOAZEC, 2005 ; TORTORA et al, 2001).

2.1. Épithélium intestinal grêle

L'épithélium intestinal grêle, de type simple prismatique (TORTORA et al, 2001), est organisé, selon l'axe vertical, en **unités cryptes-villosités**. Les cryptes, aussi appelées crypte de Lieberkühn, sont des invaginations de l'épithélium dans le tissu connectif

sous-jacent, tandis que les villosités ressemblent à des protubérances en forme de doigts, projetées dans la lumière intestinale (CROSNIER et al, 2006) (Fig. 3a).

Trois types cellulaires différenciés principaux peuplent les villosités : les cellules absorbantes (~80-90 %), les cellules caliciformes (~5-10 %) et les cellules entéroendocrines (<1 %) (Fig. 3b). Les **cellules absorbantes**, ou entérocytes, sécrètent des hydrolases et absorbent les nutriments. Les **cellules caliciformes**, plus abondantes dans la partie distale de l'intestin grêle, sécrètent un mucus protecteur. Tandis que les **cellules entéroendocrines**, peu nombreuses, sécrètent des hormones incluant la sérotonine, la substance P et la sécrétine (HOCKER et WIEDENMANN, 1998). Un quatrième type cellulaire différencié se retrouve dans le fond des cryptes, soit les **cellules de Paneth**. Ces dernières, qui ont un rôle de défense de l'épithélium intestinal, sécrètent des peptides antimicrobiens et des enzymes (cryptidine, défensine et lysozyme) (PORTER et al, 2002 ; SANCHO et al, 2004) (Fig. 3b).

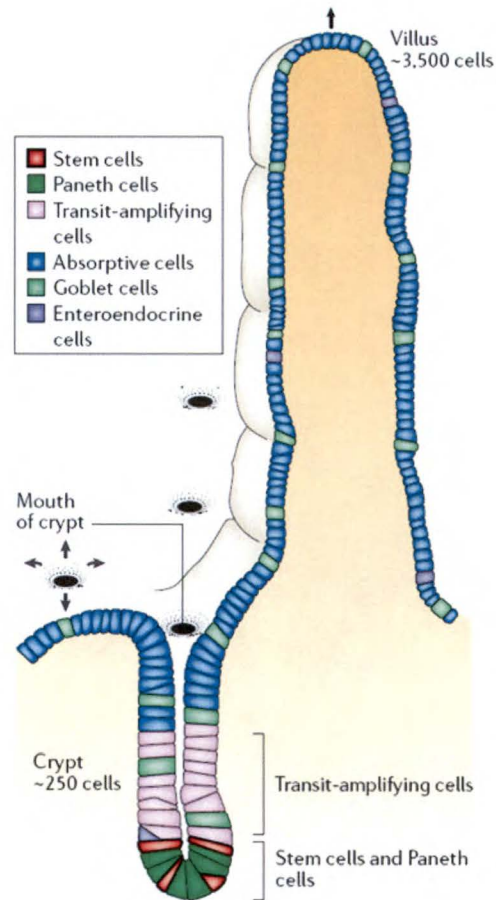
Le renouvellement du revêtement de l'épithélium intestinal se fait à une vitesse extraordinaire, dépassant tous les autres tissus des vertébrés (CROSNIER et al, 2006). Ce renouvellement est pris en charge par des **cellules souches**, confinées au fond des cryptes de Lieberkühn. Ces cellules multipotentes donnent naissance à des cellules progénitrices qui à leur tour proliféreront pour 4 à 6 divisions, formant une population de cellules transitoires, situées à la mi-portion de chaque crypte. Il est à noter que plusieurs cryptes entourent la base de chaque villosité et donc les cellules d'une villosité proviennent de différentes cryptes avoisinantes. Les cellules souches intestinales permettent la formation des quatre types majeurs de cellules différenciées de l'épithélium. Les trois types formant les villosités (cellules absorbantes,

Figure 3. Structure et cellules de l'épithélium intestinal grêle

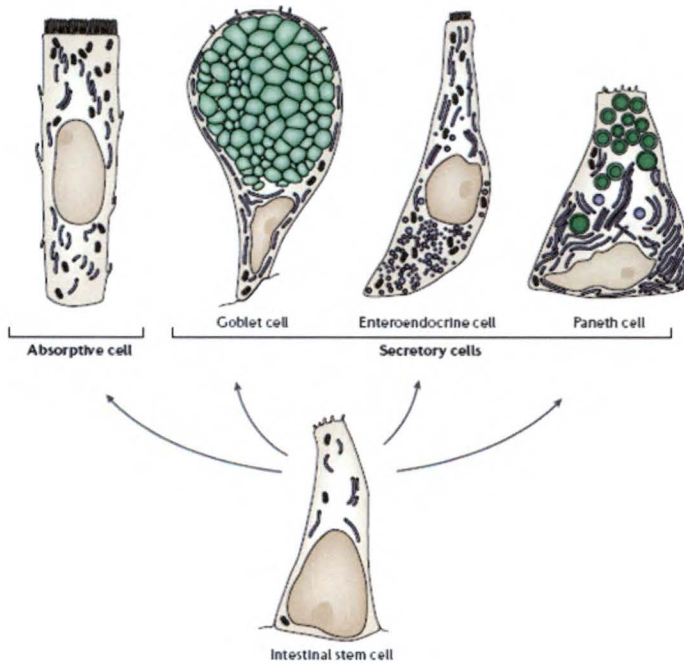
A) Unité crypte-villosité. Représentation d'une villosité avec l'une des cryptes contribuant au renouvellement de son épithélium. Les flèches indiquent le flot ascendant des cellules à la sortie de la crypte. Les cellules souches se trouvent proches de la base des cryptes ; il est encore incertain si elles se trouvent parmi ou sous les cellules de Paneth. Au dessus des cellules souches se trouvent les cellules filles progénitrices. Puis, au dessus des cellules progénitrices, à la jonction crypte-villosité, se retrouvent des cellules post-mitotiques différenciées (cellules absorbantes, cellules caliciformes et cellules entéroendocrines) (CROSNIER et al, 2006).

B) Cellules épithéliales intestinales. Il existe quatre principaux types de cellules différenciées au niveau de l'épithélium intestinal. Ces quatre types sont regroupés en deux classes : la classe des cellules absorbantes, et la classe des cellules sécrétrices, comprenant les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (CROSNIER et al, 2006).

A



B



caliciformes et entéroendocrines) se différencient lors de leur migration ascendante, de la crypte vers une villosité adjacente. Lorsque ces cellules atteignent l'apex de la villosité, environ 2 à 5 jours suivant leur dernière division, elles sont relâchées dans la lumière intestinale par anoïkose. La quatrième lignée cellulaire épithéliale, les cellules de Paneth, vont plutôt se différencier lors d'un processus de migration descendante vers le fond des cryptes, où elles résideront pour environ 20 jours, avant d'être phagocytées par leurs semblables (STAPPENBECK et al, 1998).

Avec un nombre impressionnant de nouvelles cellules produites chaque jour (les cellules progénitrices se divisent à toutes les 12-16 h, générant 200 cellules par crypte chaque jour (SANCHO et al, 2004)), de rigoureux mécanismes du maintien de l'homéostasie épithéliale doivent être présents. Premièrement, la production cellulaire cryptale est compensée par la perte de cellules à l'apex des villosités (intestin grêle) ou à la surface de l'épithélium (côlon). Deuxièmement, le feuillet épithélial est dans un mouvement ascendant continu et seulement les cellules de Paneth et les cellules souches, localisées dans le fond des cryptes, échappent à ce flot. Troisièmement, la prolifération de l'épithélium intestinal n'est pas autonome (HERMISTON et al, 1996), mais elle est plutôt dictée par la niche cryptale. Donc, les compartiments prolifératifs et de différenciation sont maintenus malgré la transition des cellules le long de l'axe crypte-villosité (SANCHO et al, 2004).

2.2. Épithélium intestinal colique

L'épithélium colique est de type simple prismatique plat (TORTORA et al, 2001), et comprend des **cellules absorbantes** (entérocytes cylindriques), de nombreuses

cellules caliciformes et des **cellules entéroendocrines** très dispersées, mais **pas de cellules de Paneth** (Fig. 4). Les cellules absorbantes sont abondantes à la surface de la muqueuse et dans le tiers supérieur des glandes. Dans les deux tiers inférieurs des glandes, l'épithélium est presque entièrement composé de cellules caliciformes. Elles sécrètent un mucus abondant qui facilite la progression du contenu intestinal et protège l'épithélium du frottement des matières fécales progressivement concentrées. La durée de vie des cellules de l'épithélium colique est d'environ six jours. Les **cellules souches** sont localisées dans les profondeurs des glandes (Fig. 4). Leurs descendances se divisent et se différencient au fur et à mesure qu'elles migrent vers le haut afin de remplacer les cellules perdues au niveau des zones d'extrusion sur la surface, à mi-chemin entre les ouvertures des glandes voisines. À intervalles réguliers, tout au long du côlon, des follicules lymphoïdes sont visibles dans le chorion, certains sont assez étendus pour pénétrer jusque dans la sous-muqueuse (FAWCETT et al, 2002).

2.3. Modèles cellulaires

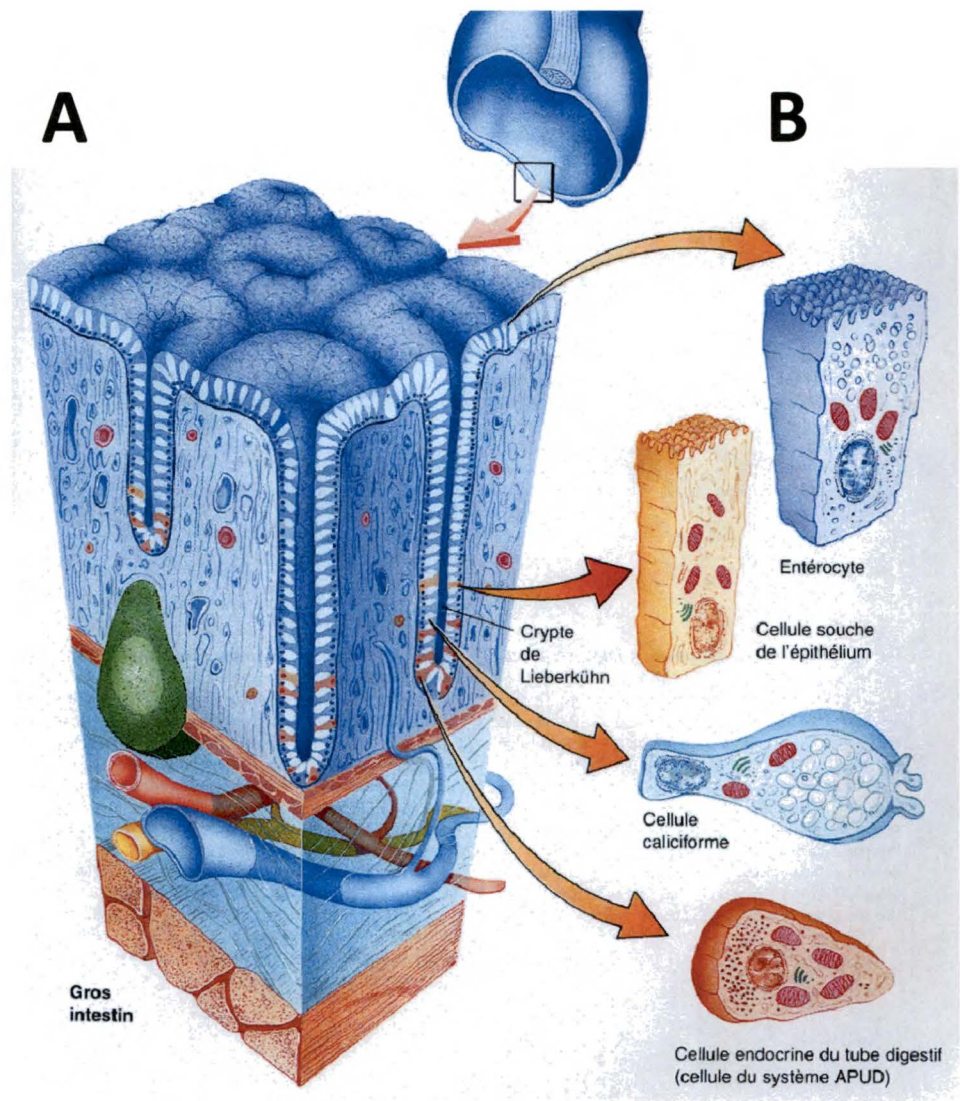
Les mécanismes menant à la détermination épithéliale et à l'expression protéique spécifique des cellules épithéliales intestinales sont encore très mal compris. Bien que les modèles de souris transgéniques soient des outils puissants pour élucider les cascades moléculaires impliquées dans ces processus, la culture cellulaire permet, de façon simple et élégante, l'étude des comportements, de l'interaction et de la signalisation cellulaires, pour ne nommer que ceux-là (SIMON-ASSMANN et al, 2007).

Figure 4. Structure et cellules de l'épithélium colique

A) Glande colique. Représentation de l'épithélium de surface du côlon et des glandes coliques qui soutiennent son renouvellement cellulaire. Les cellules souches se situent vers le fond des glandes. Les cellules progénitrices sont amplifiées par des divisions cellulaires constantes le long des deux tiers inférieurs des glandes. Le cycle cellulaire arrête et la différenciation des cellules se produit lorsque les cellules progénitrices atteignent le tiers supérieur des glandes.

B) Cellules épithéliales coliques. Il existe 3 types principaux de cellules différenciées au niveau de l'épithélium colique : les cellules absorbantes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines.

(A-B, Figures tirées du livre : Atlas en couleur d'histologie (GARTNER et HIATT, 2004)).



2.3.1. Cellules IEC-6 et IEC-6/Cdx2

Les cellules IEC-6 sont une lignée de cellules épithéliales normales, dérivée d'iléon de rat adulte et développée dans le laboratoire du Dr. Quaroni (QUARONI et al, 1979). Les cellules IEC-6 ont des caractéristiques de cellules intestinales de type cryptal, mais ne présentent pas de morphologie de différenciation et n'expriment pas non plus de gènes de différenciation (SUH et TRABER, 1996 ; QUARONI et al, 1979). Ces cellules n'expriment pas le gène *Cdx2*, un gène à *homeobox* relié au gène caudal de *Drosophila melanogaster*, qui est impliqué dans la différenciation intestinale. L'équipe du Dr. Traber a forcé l'expression de *Cdx2* dans les cellules IEC-6, créant la lignée IEC-6/Cdx2 (SUH et TRABER, 1996). Lors de l'induction de l'expression de *Cdx2* dans ces cellules, il y a tout d'abord arrêt de prolifération pour plusieurs jours, suivi d'une période de croissance avec l'établissement d'une culture stable à une densité supérieure que celle des cellules n'exprimant pas *Cdx2*. Des structures multicellulaires se développent, contenant, à la surface, des cellules polarisées absorbantes et des cellules caliciformes. De plus, ces cultures expriment l'ARNm de la sucrase-isomaltase (SI), un marqueur moléculaire de différenciation (SUH et TRABER, 1996). On y retrouve également l'expression de la protéine GATA4, et très peu d'expression de GATA5 et GATA6 (BOUDREAU et al, 2002).

2.3.2. Cellules Caco-2/15

Pageot et ces collaborateurs (PAGEOT et al, 2000), rapportent que durant plus de deux décennies, les lignées cellulaires de cancers colorectaux humains ont servi comme modèles expérimentaux pour aider à la compréhension des mécanismes

biologiques et moléculaires associés au cancer colorectal humain. Fait intéressant, parmi plus de 100 lignées cellulaires d'adénocarcinomes dérivées de côlons humains et analysées sous différentes conditions de culture, seulement quelques-unes ont montré des propriétés biochimiques et/ou morphologiques associées avec l'épithélium intestinal grêle.

Seulement une lignée, **Caco-2**, montre spontanément des caractéristiques typiques d'entérocytes différenciés (FOGH et al, 1977 ; PINTO et al, 1983). En effet, sous des conditions de cultures standards, les cellules Caco-2 forment une monocouche confluente. Après une période de 20 à 40 jours de culture post-confluence, les cellules Caco-2 acquièrent graduellement une polarisation morphologique complète avec des complexes jonctionnels et une bordure en brosse typique des entérocytes fonctionnels, ainsi qu'un niveau relativement élevé d'hydrolases de la bordure en brosse, incluant la sucrase-isomaltase et la lactase-phlorizin hydrolase (BEAULIEU et QUARONI, 1991 ; HAURI et al, 1985 ; PINTO et al, 1983 ; VACHON et BEAULIEU, 1992). L'expression de caractéristiques de l'intestin grêle (ex : SI et lactase), dans des lignées établies à partir du côlon, s'explique par le fait que ces cellules montrent des similitudes avec celles retrouvées dans l'épithélium fœtal intestinal humain, qui, avant 20-22 semaines, est similaire autant dans l'intestin grêle que dans le côlon (MENARD et BEAULIEU, 1994 ; ROUSSET, 1986 ; ZWEIBAUM et CHANTRET, 1989). Finalement, un désavantage certain de cette lignée cellulaire humaine, comparativement aux cellules IEC-6/Cdx2 qui bien qu'elles proviennent du rat sont des cellules normales, réside dans son origine cancéreuse.

2.3.3. Co-culture mésenchyme-épithélium

L'homéostasie intestinale est dépendante d'une communication bidirectionnelle entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses sous-jacentes (HAFFEN et al, 1987 ; MONTGOMERY et al, 1999 ; LUSSIER et al, 2008). Par exemple, la voie Wnt/ β -caténine contrôle la prolifération ainsi que la migration des entérocytes et des cellules de Paneth (GREGORIEFF et al, 2005 ; LUSSIER et al, 2008). Dans cet ordre d'idée, Mme Carine Lussier, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Dr. Boudreau, a établi un système de co-culture mésenchyme-épithélium. La déposition de cellules épithéliales intestinales de rat (IEC) sur des cellules mésenchymateuses intestinales humaines, permet la polarisation et la différenciation en culture. Ces cellules montrent des caractéristiques morphologiques d'un épithélium et supportent l'expression de plusieurs marqueurs fonctionnels de l'intestin (LUSSIER et al, 2008). Ce tout nouveau modèle cellulaire, permet donc l'étude et l'identification des régulateurs transcriptionnels impliqués dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales normales.

3. Facteur de transcription GATA4

3.1. Généralités

La protéine GATA4 (GATA binding protein 4) fait partie de la famille des facteurs de transcription GATA, qui compte à ce jour 6 membres (GATA1 à GATA6) chez les vertébrés. Le nom de cette famille vient du fait que ces facteurs de transcription lient une séquence nucléotidique contenant le motif consensus (A/T)GATA(A/G). En

fonction de leur patron d'expression, les protéines GATA ont été divisées en deux sous-classes, la sous-classe **GATA1, 2 et 3**, et la sous-classe **GATA4, 5 et 6**. Les gènes de la première sous-classe (*GATA1, 2 et 3*) sont exprimés principalement dans les cellules souches hématopoïétiques, où ils régulent la différenciation et l'expression de gènes spécifiques dans les lymphocytes T, les cellules érythroïdes et les mégacaryocytes. Tandis que les gènes de la deuxième sous-classe (*GATA4, 5 et 6*) sont exprimés dans des tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme tels que le cœur, le foie, les poumons, les gonades et l'intestin, où ils jouent un rôle critique dans la régulation de l'expression de gènes tissus spécifiques.

Le gène murin *Gata4* fut cloné en avril 1993 par Arceci et al., qui était à la recherche de l'existence d'autres membres de la famille de facteurs de transcription GATA, *Gata1, 2 et 3* ayant déjà été rapportés dans la littérature (ARCECI et al, 1993 ; KELLEY et al, 1993). *Gata4* est composé de 7 exons et d'aucun intron, il est situé sur le chromosome 14, dont 1326 pb composent sa région codante. L'expression de *Gata4* est inductible par l'acide rétinoïque (ARCECI et al, 1993) et est tissu spécifique. Son ARNm est retrouvé, chez la souris adulte, au niveau du cœur, des ovaires, des testicules, des poumons, du foie et de l'intestin grêle. Chez l'embryon et le fœtus murin, *Gata4* est exprimé dans le cœur, l'intestin proximal et distal, les testicules, les ovaires, le foie, l'endoderme viscéral et l'endoderme pariétal (MOLKENTIN, 2000). Le gène humain *GATA4* se situe plutôt sur le chromosome 8 (8p23.1-p22), il possède lui aussi 7 exons et aucun intron et sa région codante est composée de 1329 pb.

3.2. Domaines de la protéine GATA4

Le gène murin de *Gata4* encode pour une protéine de 441 a.a. et de 48 kDa. Elle contient un domaine de liaison à l'ADN composé de deux **doigts de zinc** conservés (N- et C-terminal) de type IV, constitués de quatre cystéines entourant un atome de zinc (Cys- X_2 -Cys- X_{17} -Cys- X_2 -Cys), et de deux portions adjacentes d'**acides aminés basiques** (Fig. 5A). Les protéines Gata4, 5 et 6 ont un pourcentage d'identité d'environ 85 % au niveau de leurs séquences en acides aminés des régions contenant les doigts de zinc et des régions basiques, (Fig. 5B). De plus, Gata4 possède environ 70 % d'identité avec Gata1 et le gène pannier de *Drosophila*, au niveau de la région de liaison à l'ADN, suggérant un haut de degré de conservation de séquences entre les divers membres de la famille GATA et entre les espèces au cours de l'évolution (MOLKENTIN, 2000).

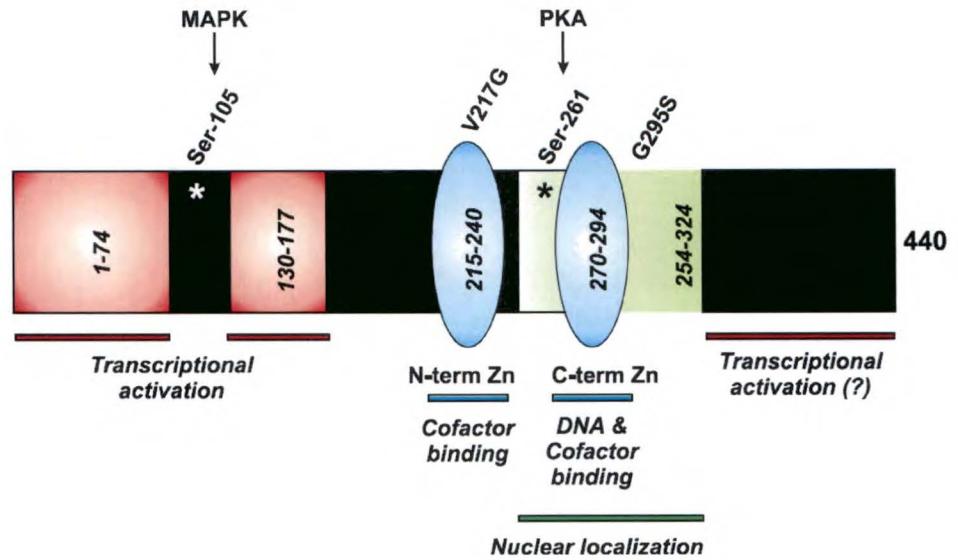
Une étude menée par Morrisey et al. a montré que le doigt de zinc en C-terminal et la région basique adjacente sont nécessaires et suffisants pour conférer la capacité de liaison à l'ADN de la protéine Gata4 murine (MORRISEY et al, 1997). À cet effet, une analyse par RMN de la protéine GATA4 du poulet, a montré que le doigt de zinc en C-terminal interagit avec le sillon majeur de l'ADN, tandis que le domaine basique adjacent établit des contacts physiques avec le sillon mineur de la séquence de reconnaissance (OMICHIŃSKI, TRAINOR et al, 1993). De plus, ces mêmes régions démontrent une double fonction, en effet, en plus de moduler la liaison à l'ADN, ils permettent aussi la localisation nucléaire de GATA4. Le NLS (*nuclear localisation sequence*) de GATA4

Figure 5. La protéine murine Gata4

A) Structure de la protéine. Gata4 contient deux doigts de zinc distincts (représentés en bleu) et un domaine de localisation nucléaire (représenté en vert) qui ensemble, constituent ses domaines de liaison à l'ADN et d'interaction protéine-protéine. Gata4 contient également deux domaines d'activation transcriptionnelle (représentés en rouge) situés en N-terminal. La sérine-105 (Ser-105) de la protéine est une cible de phosphorylation pour les MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et la sérine-261 (Ser-261) est une cible pour la protéine kinase A (PKA). Les mutations ponctuelles des acides aminés V217G (la valine 217 changée pour une glycine) et G295S (la glycine 295 changée pour une sérine) abolissent les interactions avec la protéine FOG-2 (*Friend of GATA-2*) et TBX-5 respectivement (PIKKARAINEN et al, 2004).

B) Séquence en acides aminés. Représentation de la séquence en acides aminés des deux doigts de zinc et du domaine basique adjacent de Gata4, 5 et 6. Les séquences en acides aminés de Gata1 murin et de pannier de *Drosophila* sont également représentées pour comparaison. Les chiffres à gauche de la figure indiquent les positions des acides aminés au niveau des séquences peptidiques correspondantes. Les régions colorées indiquent l'identité avec Gata4 (consensus), alors que les régions incolores indiquent des différences entre les séquences en acides aminés. Les astérisques montrent les cystéines qui génèrent chaque sous-domaine des doigts de zinc, alors que la flèche pointe la position d'une insertion d'acide aminé en 3' (séquence non figurée) qui est présente seulement chez *D. pannier* (MOLKENTIN, 2000).

A



B

		N-terminal finger		Basic-region
(216-265)	mGATA-4	CVNCGAMSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGINRPLIKPQRRLSASRR		
(196-245)	mGATA-5	CVNCGALSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGVNRPLVRPQKRLSSSRR		
(384-433)	mGATA-6	CVNCGSIQTPLWRRDGTGHYLCNACGLYSKMNGLSRPLIKPKRVPSSRR		
(204-253)	mGATA-1	CVNCGATATPLWRRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKKRMIVSKR		
(11-63)	pannier	CVNCGATSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGMNRPLIKPSKRLVSARR		
				↑
		C-terminal finger		Basic-region
(270-322)	mGATA-4	CANCQTTTTTLWRRNAEGEPVCNACGLYMKLHGVPRLAMRKEGIQTRKRKPK		
(250-302)	mGATA-5	CSNCHTATTTTLWRRNSEGEPVCNACGLYMKLHGVPRLAMKKEGIQTRKRKPK		
(438-490)	mGATA-6	CANCHTTTTTLWRRNAEGEPVCNACGLYMKLHGVPRLAMKKEGIQTRKRKPK		
(258-310)	mGATA-1	CTNCQTTTTTLWRRNASGDPVCNACGLYFKLHQVNRPLTMRKDGIIQTRNRKAS		
(68-120)	pannier	CTNCGTRTTTTLWRRNNDGEPVCNACGLYYKLHGVPRLAMRKDGIQTRKRKPK		

se situe en aval du doigt de zinc en C-terminal, dans le domaine basique adjacent (Fig. 5A).

Il est également connu que GATA4 contient deux **domaines d'activation de la transcription** (TAD I et TAD II) situés dans la partie N-terminale de la protéine murine (Fig. 5A) (MORRISEY et al, 1997). Malgré le fait que la partie C-terminale de la protéine (a.a. 334-440) soit requise pour l'activité transcriptionnelle de la protéine native, cette portion ne contient pas de TAD indépendant. Le domaine d'activation I, de la protéine murine, est composé par les résidus d'acides aminés 1 à 74 et il comprend huit résidus proline, huit résidus sérine, quatre résidus tyrosine et trois résidus thréonine. Ce domaine a été conservé au cours de l'évolution, avec une homologie de séquence de 82 % et 50 % avec la protéine GATA4 chez l'humain et *Xenopus* respectivement, comparativement à la protéine murine. Le domaine d'activation II, de la protéine GATA4 murine, est composé des résidus 130 à 177 et comprend trois résidus proline, cinq résidus sérine, quatre résidus tyrosine et un résidu glutamine. Ce domaine est aussi conservé à travers les espèces, démontrant respectivement 96%, 43 % et 38 % d'homologie de séquence avec la protéine GATA4 chez l'humain, le poulet et *Xenopus*, comparativement à la protéine murine. Ces deux domaines (TAD I et II) de GATA4 ont également une homologie avec les domaines présents chez GATA5 et 6, mais aucune homologie n'est retrouvée avec les domaines d'activation de la transcription préalablement identifiés chez GATA1 et 3.

3.3. Activité transcriptionnelle de GATA4

Il est connu que les facteurs GATA reconnaissent universellement les **motifs de séquences GATA** sur l'ADN. Cependant, des différences au niveau du cœur du motif GATA et des nucléotides adjacents, par exemple **CGATGG** et **AGATTA** (SVENSSON et al, 1999), permettent des liaisons différentielles parmi les divers membres GATA exprimés dans un tissu spécifique (MERIKA et ORKIN, 1993; KO et ENGEL, 1993). À cet effet, il est rapporté que le promoteur de la chaîne lourde de l' α - et β -myosine des myocytes cardiaques, est préférentiellement activé par GATA4 plutôt que par GATA6 (CHARRON et al, 1999). L'affinité individuelle, des facteurs GATA4, 5 et 6 pour une variété de promoteurs, pourrait dépendre de la séquence des nucléotides adjacents à l'élément GATA, comme nous venons de le voir, ou de l'interaction avec des cofacteurs et d'autres facteurs de transcription. Cette dernière option permettrait aux facteurs GATA d'agir comme régulateur tissu-spécifique. Par exemple, GATA4 interagit physiquement avec les facteurs de transcription Nkx2.5, MEF-2 et NFATc4 (*nuclear factor of activated T-cells-c4*), qui sont eux-mêmes coexprimés uniquement dans le myocarde (MOLKENTIN, 2000). Aussi, GATA4 est reconnu pour établir une interaction avec Cdx2, un facteur de transcription spécifique de l'épithélium intestinal adulte (BOUDREAU et al, 2002).

Mais à ce moment, comment GATA4 fait-il pour interagir avec d'autres protéines ? Alors que seul le doigt de zinc en C-terminal est requis pour une liaison spécifique à l'ADN, le doigt de zinc en N-terminal pourrait être disponible pour établir une interaction avec une autre protéine. À cet effet, il a été rapporté que GATA4 peut interagir avec la protéine modificatrice de la transcription FOG-2 (*friend of GATA-2*),

via une interaction physique impliquant son doigt de zinc N-terminal (LU et al, 1999 ; SVENSSON et al, 1999 ; TEVOSIAN et al, 1999). Il n'est cependant pas clair comment le doigt de zinc C-terminal de GATA4 peut à la fois médier des interactions avec d'autres protéines et établir le contact avec les nucléotides du sillon majeur de l'ADN.

Finalement, l'activité transcriptionnelle de GATA4 peut être modulée autant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-traductionnel. Par exemple, chez les myocytes cardiaques, il a été rapporté que la quantité d'ARNm de GATA4 augmente en réponse à une stimulation hypertrophique (XIA et al, 2000 ; MOKKENTIN, 2000). D'un autre côté, les stimuli qui induisent une hypertrophie et/ou une insuffisance cardiaque sont connus pour augmenter l'activité transcriptionnelle de GATA4 par phosphorylation. À cet effet, une surcharge de pression, l'isoproterenol, la phenylephrine, l'endotheline-1, l'angiotensine II et les esters de phorbol peuvent tous induire une phosphorylation de GATA4 (sur la sérine 105), via les MAPK ERK1/2 ou p38, résultant en une augmentation de la liaison à l'ADN et/ou de l'activité transcriptionnelle de celle-ci (LIANG et al, 2001 ; OKA et al, 2007).

3.4. Fonctions de GATA4 au niveau intestinal

La protéine GATA4 est tout d'abord connue pour jouer un rôle au niveau de la différenciation de l'endoderme viscéral (SOUDAIS et al, 1995). On reconnaît aussi, à ce facteur de transcription, la capacité d'activer la transcription de certains gènes marqueur de la différenciation des cellules épithéliales intestinales : IFABP (GAO et al, 1998), lactase-phlorizin hydrolase (LPH) (FANG et al, 2001 ; van WERING et al,

2004) et sucrase-isomaltase (SI) (BOUDREAU et al, 2002). GATA4 régule aussi la transcription d'autres gènes intestinaux : l'adénosine déaminase (ADA) (DUSING et al, 2003), la claudine-2 (ESCAFFIT et al, 2005) et Muc2 (van der SLUIS et al, 2004). Il est aussi connu que GATA4 n'agit pas seul dans l'activation transcriptionnelle. Par exemple dans le cas de la sucrase-isomaltase, GATA4 a besoin de ces partenaires HNF-1 α et Cdx2 pour réguler la transcription de ce gène (BOUDREAU et al, 2002), et dans le cas de la LPH, GATA4 s'associe à HNF-1 α pour une activation synergique de la transcription (van WERING et al, 2004).

Pour ce qui est de la distribution de GATA4 à travers l'épithélium intestinal, cette protéine est retrouvée selon un gradient croissant le long de l'axe crypte-villosité, avec une expression maximale dans les cellules différenciées des villosités (BOUDREAU et al, 2002 ; DUSING et WIGINTON, 2005; BOSSE et al, 2006). Plus précisément, on retrouve GATA4 dans les cellules absorbantes, ou entérocytes, et il est absent des cellules caliciformes et des cellules entéroendocrines. Selon Dusing, GATA4 serait absent des cellules de Paneth (DUSING et WIGINTON, 2005), mais d'autres études montrent une expression de GATA4 dans ces cellules de la base des cryptes (BOSSE et al, 2006). Selon l'axe céphalo-caudal, GATA4 est exprimé dans un gradient décroissant, avec une expression presque nulle dans l'iléon distal et il est absent du côlon (BOUDREAU et al, 2002 ; DUSING et WIGINTON, 2005; BOSSE et al, 2006). À titre comparatif, GATA5 est absent des cellules absorbantes, ou entérocytes, mais est retrouvé dans la lignée des cellules sécrétrices, soit les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (DUSING et WIGINTON, 2005). GATA6, quant à lui, est retrouvé seulement au niveau des

cellules entéroendocrines (DUSING et WIGINTON, 2005). Cette distribution suggère que ces divers facteurs GATA pourraient jouer un rôle dans la localisation et le maintien des types cellulaires, ainsi que dans la différenciation terminale.

Finalement, une étude menée par Bosse et al. rapporte les résultats de l'effet d'une inactivation de *Gata4* au niveau de l'axe horizontal de différenciation de l'intestin grêle (BOSSE et al, 2006). Puisque la délétion totale de *Gata4* résulte en la mort embryonnaire (E7.0 – E9.5) avant le développement de l'épithélium intestinal (~E14.5), ce groupe a développé un modèle murin où une inactivation inducible de *Gata4*, chez des souris adultes, est spécifique à l'intestin. Dans ce modèle, au niveau des cellules jéjunales, on retrouve premièrement, une expression diminuée des gènes spécifiques aux cellules absorbantes de cette portion du grêle (*Fabp1*, *LPH*). Puis deuxièmement, on retrouve une induction de l'expression de produits normalement absents du jéjunum mais présents dans l'iléon, spécifiquement ceux impliqués dans le transport des acides biliaires. Troisièmement, l'inactivation de *Gata4* amène une augmentation de la population des cellules caliciformes et une redistribution des sous-populations des cellules entéroendocrines, et ce, vers un phénotype iléal. Finalement, le produit du gène *Math1*, connu comme régulateur de la destinée des cellules épithéliales intestinales vers la lignée sécrétrice (YANG et al, 2001), est induit d'environ 75 %. À la lumière de ces données, GATA4 apparaît comme étant un joueur important du maintien de l'identité jéjunale vs iléale, de l'intestin grêle de souris adulte.

4. Maladies inflammatoires de l'intestin (MII)

Le terme « **maladies inflammatoires de l'intestin** » (MII), ou « *Inflammatory Bowel Disease* » (IBD), désigne, entre autres, deux maladies semblables, mais distinctes, soit la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. L'éthiopathologie de ces maladies n'est toujours pas comprise parfaitement. Cependant, il a été démontré que plusieurs facteurs peuvent être influents, tels que les facteurs environnementaux, génétiques et familiaux, le système immunitaire et non-immunitaire, ainsi que les agents microbiens.

À cet effet, il est connu que la présence de bactéries au niveau du tractus intestinal est essentielle à l'apparition de MII. Par exemple, le développement « spontané » de colites, dans un modèle animal modifié génétiquement pour promouvoir le développement de ces colites, requiert la présence d'une flore luminaire; les colites n'apparaissent chez aucun mutant lorsqu'ils sont maintenus dans un environnement stérile, mais se développent rapidement lorsque ces animaux sont colonisés par des bactéries commensales (RATH et al, 2001 ; ELSON, 1999 ; PODOLSKY, 2002).

La barrière épithéliale joue donc un rôle primordial dans le développement des MII. Lorsqu'elle est intacte, la flore bactérienne commensale est séquestrée au niveau de la lumière intestinale et est inoffensive. Cependant, lorsque des bris surviennent au niveau de cette barrière cellulaire, le passage des bactéries à travers l'épithélium est alors permis, ainsi que leur pénétration au cœur de la muqueuse intestinale. S'en suit alors une activation du système immunitaire de la muqueuse, puis l'enclenchement d'une réponse inflammatoire intestinale (Fig. 6).

Pour qu'il y ait activation d'une réponse inflammatoire, au sein des cellules épithéliales, ces dernières doivent pouvoir sentir et percevoir les changements enclenchés dans leur environnement. Premièrement, la cellule épithéliale peut sentir la présence de bactéries dans son environnement via soit, 1) l'activation des récepteurs de la famille des « *Toll-like receptor* », par reconnaissance et liaison de composés bactériens, tel le lipopolysaccharide (LPS), ou 2) via l'activation d'un récepteur intracellulaire, NOD2, encore une fois par liaison de composé bactérien tel le LPS (Fig. 7). Deuxièmement, la cellule épithéliale peut percevoir l'activation d'une réponse inflammatoire, dans les cellules avoisinantes (ex : macrophages), via deux récepteurs présents à sa surface cellulaire soit le récepteur à l'interleukine-1 (IL-1) et le récepteur au TNF (*tumor necrosis factor*) (Fig. 7). Ces récepteurs sont activés par liaison de leur ligand respectif, molécules produites par ces cellules avoisinantes activées, le TNF étant l'une des cytokines principales impliquées dans la réponse inflammatoire. Enfin, tous ces récepteurs activés mènent à une voie centrale de signalisation cellulaire, soit la translocation nucléaire du facteur de transcription NFκB, permettant alors la transcription de divers gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, tels les gènes codant pour les interleukines, les cytokines et les chimiokines (Fig. 7).

Donc, les MII résultent d'une activation inappropriée du système immunitaire de la muqueuse, conduite par la présence de la flore luminale. Cependant, jusqu'à ce jour, il demeure incertain si l'activation du système immunitaire est le résultat d'un défaut intrinsèque (activation constitutive ou échec du mécanisme de régulation négative) ou

le fait d'une stimulation continue due à un changement dans la barrière de la muqueuse épithéliale, ou les deux à la fois (PODOLSKY, 2002).

Finalement, dans les dernières années, il a été rapporté dans la littérature, et cela est maintenant reconnu par la *Fondation canadienne de maladies inflammatoires de l'intestin*, que les MII accroissent le risque de cancer colorectal (CLEVERS, 2004 ; BALKWILL et COUSSENS, 2004). Ce risque est faible, mais il augmente proportionnellement avec la durée de la MII. La probabilité de cancer colorectal après avoir souffert d'une MII pendant dix ans est évaluée à environ 2 %, et elle peut atteindre 20 % au bout de 30 ans (*Fondation canadienne de maladies inflammatoires de l'intestin*). En regard de toutes ces complications face à des maladies dont l'étiologie génétique est toujours incomprise, des efforts doivent être faits pour caractériser la régulation de la réponse inflammatoire engendrée.

Figure 6. Pathogenèse des Maladies Inflammatoires de l'Intestin

En condition physiologique, l'épithélium, avec ses jonctions serrées et les produits des cellules caliciformes, principalement les TFF (*trefoil factor*) et les mucines, fournit une barrière effectrice contre les pathogènes de la lumière intestinale. L'intégrité de la barrière peut être compromise par des variations génétiques dans les déterminants moléculaires, une diminution de la réponse de réparation relativement à des dommages, ou par des agents exogènes tels les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens. La stimulation du système immunitaire de la muqueuse, menant à l'inflammation chronique et récurrente, peut résulter, d'une part, de la pénétration des produits bactériens dans la muqueuse intestinale. Leurs interactions directes avec les cellules immunitaires, spécialement les cellules dendritiques et la population de lymphocytes, promeuvent alors une réponse immunitaire adaptative classique. Alternativement, les produits bactériens peuvent stimuler la surface épithéliale. L'épithélium peut en retour produire des cytokines et des chimiokines qui recrutent et activent les cellules immunitaires de la muqueuse. L'activation des cellules présentatrices d'antigènes classiques, telles que les cellules dendritiques, ou la stimulation directe par des récepteurs enclenchent la différenciation des cellules Th1 (*type 1 helper T cells*), ou Th2 atypiques (*type 2 helper T cells*). Les produits des cellules Th1 entraînent une boucle d'activation avec les macrophages. En plus de produire des cytokines qui stimulent les cellules Th1 (IL-12, IL-18, *macrophage inhibitor factor*), les macrophages produisent une soupe de cytokines inflammatoires, incluant l'IL-1, l'IL-6, le TNF, qui ciblent un large éventail de types cellulaires (PODOLSKY, 2002).

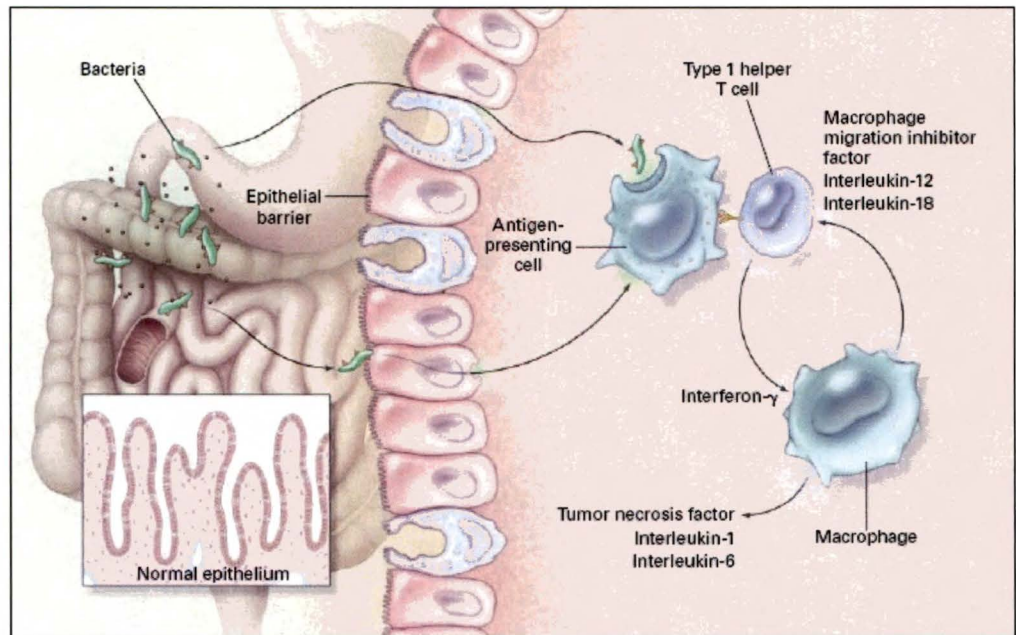
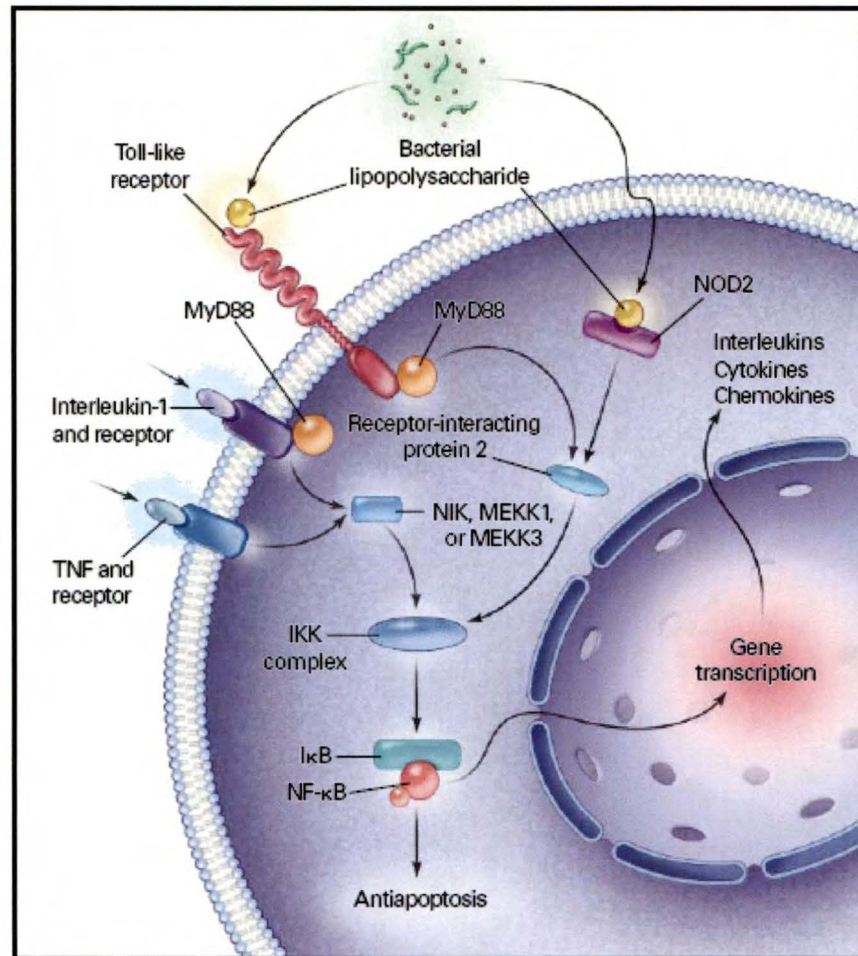


Figure 7. Voies communes d'activation cellulaire des MII

L'activation du facteur de transcription NFκB, est une voie commune et centrale de l'activation cellulaire et de la production de divers médiateurs inflammatoires, incluant une variété de cytokines et chimiokines. Elle module aussi la résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose). Plusieurs facteurs inflammatoires, impliqués dans les MII, activent NFκB par la stimulation intermédiaire de kinases, telles NIK (*NFκB-inducing kinase*) ou MEKK1, 3 (*mitogen-activated protein kinase 1 ou 3*) ou par la liaison d'un récepteur (*receptor-interacting protein 2*). Cela mène à l'activation de la kinase IKK et de la phosphorylation subséquente de l'inhibiteur de NFκB, IκB, qui se dissocie de NFκB, et sera dégradé par le protéasome suite à son ubiquitylation. NFκB peut alors transloquer au noyau, où il peut activer la transcription de gènes associés à la réponse inflammatoire.

Les médiateurs qui activent cette voie, incluent les cytokines inflammatoires, tels l'IL-1 et le TNF, qui lient leur récepteur cellulaire spécifique. Ainsi que les composés bactériens, tel le lipopolysaccharide (LPS), qui lie soit un récepteur de la surface cellulaire, membre de la famille des *toll-like receptors*, soit un récepteur intracellulaire, NOD2/CARD15 (PODOLSKY, 2002).



5. La protéine PAP

5.1. Origine

La découverte de la protéine PAP remonte à quelques années. Comme elle a été décelée dans différents contextes, différents noms lui ont donc été accordés. L'éditorial de Closa, Motoo et Iovanna en 2007, décrit bien l'origine de cette nouvelle protéine (CLOSA et al, 2007).

En 1984, Keim et al. ont rapporté la présence d'une nouvelle protéine dans le suc pancréatique de rats, après l'induction d'une pancréatite aiguë (KEIM et al, 1984). Due à sa relation avec l'induction de pancréatite, la protéine fut nommée « *pancreatitis associated protein* » ou **PAP**. Quatre années plus tard, Tachibana et al. ont décrit le **peptide 23** comme étant une protéine provenant de l'hypophyse de rat, possédant une synthèse stimulée par l'hormone de libération de l'hormone de croissance, la GHRH (*growth hormone-releasing hormone*) et inhibée par la somatostatine (TACHIBANA et al, 1988). Seulement quatre années plus tard, Katsumata et al., ont rapporté qu'en fait le peptide 23, identifié en 1988, était identique à PAP (KATSUMATA et al, 1995). Finalement, Lasserre et al., ont démontré que l'ARNm de PAP était surexprimé dans 7 de 29 carcinomes hépatocellulaires, et ont nommées la protéine codée **HIP** (*hepatocarcinoma-intestine-pancreas*) (LASSERRE et al, 1992).

Dans ce mémoire, le nom PAP sera utilisé pour l'homologue humain et de rat, tandis que le nom RegIIIγ sera utilisé pour l'homologue murin.

5.2. Généralités

L'expression de PAP est observée dans plusieurs organes : au pancréas, dans les cas de pancréatite aiguë (KEIM et al, 1994) ; à l'intestin grêle, en condition physiologique de base (IOVANNA et al, 1993) et augmenté en cas d'inflammation (GIRONELLA et al, 2005) ; au côlon, en condition pathologique (MII, cancer colorectal) (GIRONELLA et al, 2005 ; RECHRECHE et al, 1999 ; MOTOO et al, 1999) ; au cerveau, chez les patients atteints d'Alzheimer (DUPLAN et al, 2001) ; à l'utérus (CHAKRABORTY et al, 1995) ; au niveau d'une sous-population de neurones moteurs en développement et dans les neurones sensitifs et moteurs suite à une neuropathie (NISHIMUNE et al, 2000 ; FOLCH-PUY et al, 2006).

La protéine PAP humaine, dont la séquence codante comprend six exons, est composée de 149 résidus d'acides aminés interreliés par trois ponts disulfures (lien S-S) (CHRISTA et al, 1994 ; HO et al, 2004). PAP montre un pourcentage d'homologie de 43 % avec la lithostathine humaine (LITA), une protéine majoritairement exprimée au niveau du pancréas. PAP et LITA possèdent un site de clivage tryptique entre les résidus Arg et Ile à l'extrémité N-terminale et peuvent former des structures fibrillaires insolubles et hautement organisées, au pH physiologique (HO et al, 2004). Le clivage de la protéine PAP de 16 kDa en un isoforme de 14 kDa (perte de 11 résidus d'a.a. de l'extrémité N-term.), résulte en un changement de la conformation globulaire de la protéine native en une protéine fibrillaire (HO et al, 2004). De plus, PAP et LITA sont exprimés très fortement à partir du stade précoce de développement de la maladie d'Alzheimer, maladie caractérisée par la présence d'agrégats de protéines filamenteuses (HO et al, 2004).

L'analyse informatique de la séquence de la protéine PAP suggère une relation structurelle avec les lectines. PAP contient un domaine de liaison des glucides caractéristique des lectines de type-C (*carbohydrate binding domain of the Ca^{2+} -dependent lectins* ou *C-type lectin carbohydrate recognition domain*, CRD), cela fait donc de cette protéine un membre de la sous-famille VII des lectines de type-C (HO et al, 2004). Les ligands associés aux lectines de type VII sont mal caractérisés. Cependant, il fut déterminé que PAP a la capacité de se lier spécifiquement au mannane, un polysaccharide composé de mannose polymérisé. Il ne peut toutefois lier aucun monosaccharide, pas même le mannose (CASH et al, 2006). Contrairement aux lectines de type-C, dont la liaison à leur ligand est favorisée par le Ca^{2+} , la liaison de PAP au mannane est inhibée par le Ca^{2+} (CASH et al, 2006).

5.3. Implications/fonctions de PAP

Les rôles physiologiques précis de PAP ne sont pas encore totalement définis. Plusieurs fonctions ont été attribuées aux membres de la famille PAP, incluant l'inhibition de l'apoptose (ORTIZ et al, 1998 ; MALKA et al, 2000 ; FOLCH-PUY et al, 2006) ainsi que la promotion de la régénération cellulaire et de la prolifération, par exemple dans les neurones moteurs (NISHIMUNE et al, 2000 ; FOLCH-PUY et al, 2006). Dans le pancréas, il est connu que l'augmentation de l'expression de PAP est fonction de la sévérité de la pancréatite. Les niveaux sériques de PAP peuvent être mesurés et servir de marqueur pour la présence et la sévérité de la maladie (KEIM et al, 1994). L'ARNm de PAP est aussi exprimé dans les cellules cancéreuses, dont les adénocarcinomes ductaux du pancréas et son niveau d'expression est encore une fois

relié à la sévérité de la maladie (métastases, courte survie) ainsi qu'à l'agressivité de la tumeur (XIE et al, 2003).

5.3.1. Au niveau intestinal

Chez le rat, les transcrits de PAP (PAPI et III) sont détectés dans le duodénum, le jéjunum, et l'iléon (IOVANNA et al, 1993). Cette expression, de l'ARNm dans l'intestin grêle, est à peine détectable entre le jour 20 de gestation et 21 jours d'âge chez le rat et la souris. L'expression augmente ensuite fortement entre 21 et 45 jours d'âge, ce qui correspond à la période de sevrage, et reste constante par la suite (SANSONETTI et al, 1995 ; CASH et al, 2006). De plus, les rats dont la diète est faible en glucides présentent une diminution de l'expression de l'ARNm de PAPI, tout comme ceux qui ont subi une thyroïdectomie ou une ovariectomie (SANSONETTI et al, 1995). L'ensemble de ces données montrent que l'expression de PAPI subit une régulation temporelle, nutritionnelle et hormonale. La protéine est également détectée, par immunolocalisation, dans l'intestin grêle et ce, selon un gradient croissant le long de l'axe céphalo-caudal (IOVANNA et al, 1993). Son expression est retrouvée à la base des cryptes, dans les cellules de Paneth et dans les cellules caliciformes en cours de différenciation (MASCOTRA et al, 1995). Cependant, une étude différentielle de l'expression génique de l'axe crypte-villosité a également prédit que PAP pourrait être plus fortement exprimée au niveau villositaire qu'au niveau cryptal (STEGMANN et al, 2006, site : <http://gastro.imbg.ku.dk/mousecv/>).

Lors de pathologie, comme dans la phase active de la maladie cœliaque, ou dans l'inflammation de l'intestin grêle causée par la maladie cœliaque non traitée, la concentration sérique de PAP augmente (CARROCCIO et al, 1997). PAPI est aussi retrouvée dans les cellules épithéliales coliques cancéreuses, alors qu'elle est absente à l'état de base, (RECHRECHE et al, 1999 ; MOTOO et al, 1999). De plus, il y a augmentation de la concentration sérique et intestinale de PAP dans les cas de maladie de Crohn (*Crohn's disease*, CD) et de colite ulcéreuse (*ulcerative colitis*, UC), augmentation qui est proportionnelle avec la sévérité de l'inflammation (maladie inactive VS active modérée, moyenne et sévère) (GIRONELLA et al, 2005). De plus, cette augmentation semble spécifique à l'inflammation intestinale chronique, puisque la concentration sérique de PAP n'augmente pas chez les patients avec une inflammation intestinale reliée à une infection (GIRONELLA et al, 2005).

Par immunodétection, l'expression de PAP fut détectée dans les cellules épithéliales de côlon de patients atteints de CD ou d'UC. L'expression est localisée au bas des cryptes coliques, au niveau des cellules épithéliales présentant les caractéristiques morphologiques des cellules de Paneth (GIRONELLA et al, 2005). À cet effet, il est connu depuis plusieurs années que les cellules de Paneth, normalement absentes du côlon, sont retrouvées, lors de pathologie affectant le côlon ou le rectum, dans la muqueuse régénérative associée avec une inflammation chronique, dans les polypes et autour des carcinomes mucineux (SERIO et ZAMPATTI, 2000 ; SYMONDS, 1974).

Cette augmentation de l'expression de PAP aurait pour fonction de diminuer l'inflammation intestinale, en bloquant la sécrétion de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-12 et IL-18). En effet, l'ajout de PAP à des tissus

coliques de patients atteints de CD active, régule négativement la production de cytokines par un mécanisme impliquant l'inhibition de l'activation de NFκB par la voie JAK/STAT (GIRONELLA et al, 2005 ; FOLCH-PUY et al, 2006).

Enfin, il a été récemment montré que RegIIIγ, l'homologue murin de PAPI, a la capacité de lier les chaînes glucidiques peptidoglycanes retrouvées à la surface des bactéries Gram positives, et qu'il a, *in vivo*, une activité antibactérienne (CASH et al, 2006). De plus, puisque l'expression de RegIIIγ est stimulée par l'augmentation de contacts entre les bactéries et l'épithélium à la surface de la muqueuse (CASH et al, 2006), et qu'elle est également augmentée dans les cas de MII, cette protéine pourrait bien être impliquée dans la séquestration de la microflore intestinale et ainsi préserver l'homéostasie intestinale. Cependant, les facteurs et voies de signalisation impliqués dans la régulation de l'expression de cette lectine antimicrobienne ne sont toujours pas connus.

6. Problématique de recherche et objectifs

GATA4 est le membre majeur de la famille des facteurs GATA exprimé au niveau de l'épithélium intestinal. Il est retrouvé principalement au sein des cellules différenciées des villosités où il régule la transcription de gènes marqueurs de la différenciation. Notre hypothèse de départ stipulait que **GATA4 est impliqué dans le processus de différenciation des cellules épithéliales intestinales**. Nos objectifs de départ consistaient donc à :

- 1) identifier et valider de nouveaux gènes cibles de GATA4 au sein de l'épithélium intestinal,

- 2) créer une souris transgénique avec l'expression ectopique de GATA4 au niveau du côlon.

Cependant, l'étude différentielle d'analyse d'une micropuce d'ADN ne nous a permis d'identifier aucune nouvelle cible de GATA4 impliquées dans la différenciation cellulaire. Cette analyse nous a plutôt permis d'identifier de nouvelles cibles impliquées dans la réponse inflammatoire intestinale, telle PAPI. Notre seconde hypothèse stipulait donc que **PAPI est une cible de GATA4**. À cet effet, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la liaison entre le facteur de transcription GATA4 et le gène PAPI, et nous nous sommes fixés comme objectifs :

- 1) d'analyser une région promotrice du gène PAPI, de 1260 pb, par logiciel permettant la prédiction de sites d'interaction de facteurs de transcription connus,
- 2) de valider les sites d'interaction potentielle GATA sur la région promotrice du gène PAPI à l'étude, par gel de rétention,
- 3) d'analyser l'activité transcriptionnelle de GATA4 sur différentes portions du promoteur du gène PAPI, par essais transcriptionnels,
- 4) et finalement, d'analyser l'expression de PAPI et de GATA4 en contexte de stress inflammatoire.

Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Les cellules 293T et Caco-2/15

Les cellules 293T sont des cellules transformées de rein fœtal humain. La lignée cellulaire Caco-2/15, un clone de la lignée parentale Caco-2 (BEAULIEU et QUARONI, 1991), provient d'un adénocarcinome colorectal humain et a la particularité d'entamer un processus de différenciation épithéliale à l'atteinte de la confluence (PINTO et al, 1983). Ces deux types cellulaires ont été cultivés dans du milieu DMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) (ICN Biomedicals, Aurora, USA), 2 mM de glutamine (Gibco BRL, Burlington, Canada), 0,01 mM d'HEPES (Gibco BRL, Burlington, Canada) et 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Canada). Ces lignées cellulaires croissent dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO₂ est maintenu à 5 %. Du milieu frais est ajouté aux cellules à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence pour les 293T et avant la confluence pour les Caco-2/15, dans un ratio de 1 : 10.

1.2. Les cellules IEC-6 et IEC-6/Cdx2

Les cellules IEC-6, qui sont des cellules épithéliales normales dérivées d'iléon de rat adulte (QUARONI et al, 1979), et les cellules IEC-6/Cdx2, qui sont dérivées des

cellules IEC-6 où l'expression forcée du gène Cdx2 a été induite (SUH et TRABER, 1996), sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 5 % de FBS, 2 mM de glutamine, 0,01 mM d'HEPES, 100 µg/ml de pénicilline/streptomycine et 0,1 U/ml d'insuline biosynthétique humaine (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danemark). Ces lignées cellulaires croissent dans un environnement dont la température est fixée à 37°C et dont le taux de CO₂ est maintenu à 5 %. Du milieu frais est ajouté aux cellules à tous les deux jours, et les cellules ont été réensemencées à l'atteinte de la confluence, dans un ratio de 1 : 10. L'induction de la différenciation dans les cellules IEC-6/Cdx2 est réalisée par l'ajout, au milieu de culture, de 4 mM d'IPTG (Fisher, Mississauga, Canada). Le milieu avec IPTG est ensuite utilisé tout au long des cinétiques de différenciation.

1.3. La co-culture mésenchyme-épithélium

La méthode utilisée pour établir et cultiver la co-culture mésenchyme-épithélium est celle décrite par Mme Carine Lussier (LUSSIER et al, 2008). Les cellules mésenchymateuses utilisées proviennent d'iléons humains de fœtus entre 17 et 20 semaines d'âge.

2. Induction d'un stress inflammatoire cellulaire

2.1. Dans les cellules IEC-6

Au moment de l'induction d'un stress inflammatoire, les cellules IEC-6 ont été privées en sérum pour une période de 24 heures. Pour la cinétique d'induction en fonction de la concentration de lipopolysaccharide (LPS produit chez *Escherichia coli*

O111 : B4, numéro de produit : L2630) (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), des concentrations de 0, 0,1, 1, 2, 5, 10, 25 et 50 µg/ml ont été ajoutées au milieu de culture, puis les cellules ont été récoltées 2 heures plus tard. Des cellules sans induction ont aussi été récoltées au même moment comme contrôle. Pour la cinétique d'induction en fonction du temps, du TNF-alpha (Cell Sciences, Canton, USA, numéro de produit : CRT102) à 10 ng/ml a été ajouté au milieu de culture 24 heures, 4 heures, 2 heures, 1 heure et 30 minutes avant les récoltes des cellules. Des extractions de protéines totales ont ensuite été réalisées.

2.2. Dans les cellules IEC-6/Cdx2

Les cellules IEC-6/Cdx2 ont été induites à la différenciation, par ajout de 4 mM d'IPTG (Fisher, Mississauga, Canada) au milieu de culture, au moment où elles ont été réensemencées dans des plaques de culture de 6 puits. L'induction du stress inflammatoire a été réalisée lorsque les cellules ont atteint 90-95 % de confluence, par ajout de LPS (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) à 5 µg/ml ou de TNF (Cell Sciences, Canton, USA) à 5 ng/ml au milieu de culture. Les cellules induites ont été récoltées 24 heures après l'induction et des cellules sans induction ont aussi été récoltées au même moment (ctr 24h) et au moment de l'induction (ctr 0h). Des extractions d'ARN ont ensuite été réalisées.

3. Lignées cellulaires IEC-6/Cdx2 shGATA4

3.1. Clonage shRNA dans le vecteur plentiV5U6

Trois shRNA (*short hairpin*, #1, 2 et 3), spécifiquement dirigés contre l'ARNm de GATA4, ont été élaborés à l'aide du logiciel fourni par Invitrogen (Fig. 8b). Ces trois sh GATA4 ont été clonés dans le vecteur lentiviral plentiV5U6 (Fig. 8a). Les cellules IEC-6/Cdx2, n'ont qu'une faible efficacité de transfection, l'infection est alors le meilleur moyen pour intégrer un ADN exogène à ces cellules. Dans le cas présent, nous avons utilisé un vecteur lentiviral, les lentivirus ayant l'avantage de pouvoir infecter les cellules en prolifération ou non. De plus, les régions LTR du vecteur lentiviral permettent l'intégration au génome de la construction shRNA, rendant notre outil stable et transmissible aux cellules filles.

3.1.1. Purification des oligonucléotides sur gel d'acrylamide

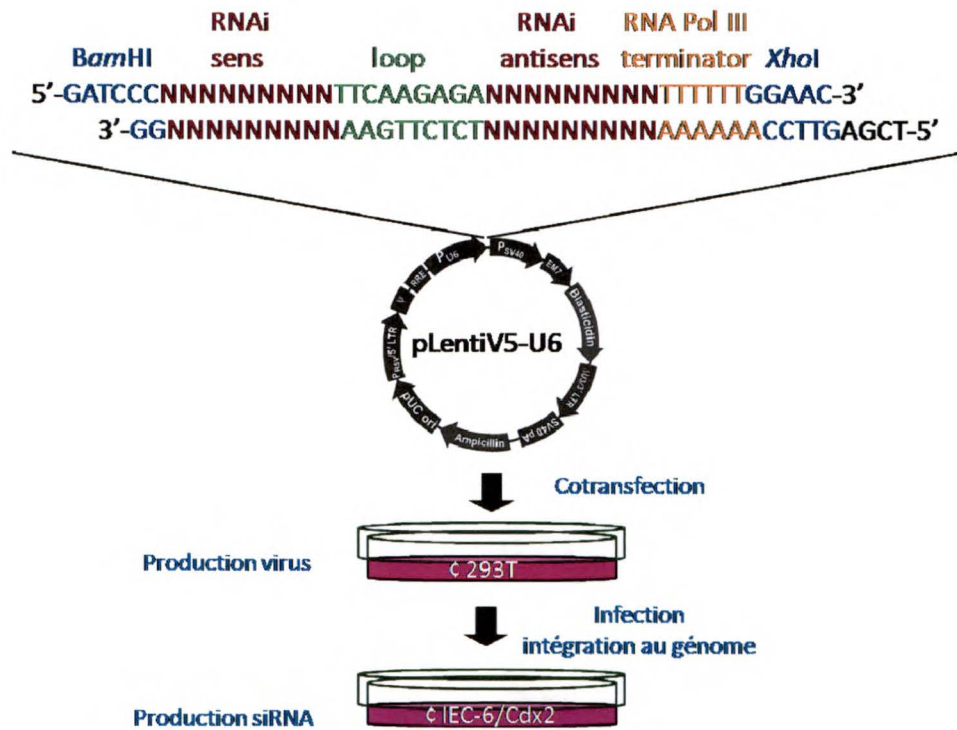
Les oligonucléotides shRNA ont été purifiés sur gel d'acrylamide 12 %. Pour ce faire les oligonucléotides shGATA4 #1, 2, 3 (Fig. 8b) ont été resuspendus dans 10 µl d'eau ultrapure. Un témoin de migration a été préparé en mélangeant 3 µl de tampon de chargement 6X (Bleu de bromophénol 0,25 %, Xylène cyanol 0,25 % et 30 % glycérol) avec 7 µl d'eau. 100 µl de formamide ont été ajoutés à tous les échantillons à migrer et ils ont été chauffés à 55°C pendant 15 minutes pour éliminer les structures secondaires et stabiliser les acides nucléiques. Les échantillons ont été migrés à 250 volts pendant environ 1 h 30 min. Les bandes ont été visualisées sous illumination UV, celles d'intérêts ont été excisées et éluées du gel par une incubation dans 800 µl de tampon TE à 4°C, O/N, sous agitation. Les échantillons ont été

Figure 8. Établissement de l'outil shRNA(GATA4)

A) Schéma expérimental. Les oligonucléotides shRNA(GATA4) utilisés, pour établir l'outil, contiennent au centre 9 bases (loop) permettant la formation d'une structure en épingle à cheveux. Ainsi que les séquences RNAi sens et antisens, spécifiques à l'ARNm de GATA4, qui formeront la structure secondaire de double brin apparenté typique au siRNA. Les oligos contiennent également une séquence de terminaison de la transcription de l'ARN polymérase III, polymérase dont l'activité est la transcription de petits ARNs, tels que les siRNA. Ces oligos hybridés ont été clonés dans le vecteur lentiviral pLentiV5-U6, en aval du promoteur U6, grâce aux séquences pour les enzymes de restriction BamHI et XhoI incluent aux extrémités des oligonucléotides sh.

B) Séquences RNAi sens et antisens des trois shGATA4 (#1, 2, 3). Les séquences RNAi sens et antisens, intégrées à la construction shRNA, sont déterminées à l'aide du logiciel fourni par Invitrogen. Elles contiennent de 20 à 21 bases et sont complémentaires l'une de l'autre.

A



B

	Séquences RNAi sens	Séquences RNAi antisens
shGATA4 #1	5'-GGG AAC AAC TCC TGA AGA ACA-3'	5'-TGT TCT TCA GGA GTT CCC-3'
shGATA4 #2	5'-GGT AGA ACT TGA AGT TGT TGA-3'	5'-TCA ACA ACT TCA AGT TCT ACC-3'
shGATA4 #3	5'-GGG CAG AGA GTG TGT CAA CT-3'	5'-AGT TGA CAC ACT CTC TGC CC-3'

centrifugés pendant 30 secondes à 16000 x g. Les surnageants ont ensuite été prélevés et les oligonucléotides ont été précipités par ajout de ½ volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et de 900 µl d'EtOH froid. Les échantillons ont ensuite été placés à -80°C pendant 1 heure. Ils ont ensuite été centrifugés à 4°C à 16000 x g pendant 30 minutes. Les culots ont été lavés à l'EtOH 70 %, puis centrifugés pendant 15 minutes à 16000 x g. Les culots ont été séchés à 37°C pendant 10 minutes, puis ils ont été resuspendus dans 80 µl d'eau. Les oligonucléotides purifiés ont ensuite été dosés par spectrophotométrie (dilution 1/50, facteur de conversion 1 unité DO_{260 nm} = 37 µg/ml) (Bio-Rad, Mississauga, Canada).

3.1.2. Hybridation des oligonucléotides purifiés

Les oligonucléotides purifiés ont été hybridés par paire, brin supérieur et inférieur de chaque shGATA4 (#1, 2, 3). L'hybridation équimolaire a été réalisée à 65°C pendant 10 minutes dans le tampon d'hybridation (100 mM Tris-HCl (pH7,5), 1 M NaCl, 10 mM EDTA (pH8,0)). Après l'incubation, la température a lentement été rétablie à TP.

3.1.3. Préparation du vecteur, ligation et transformation

Le vecteur plentiV5U6 a été digéré par BamHI (Roche, Laval, Canada) et par XhoI (Roche, Laval, Canada). Les oligonucléotides shGATA4 hybridés ont ensuite été ligués au vecteur digéré en utilisant la *T4 DNA ligase* (New England Biolabs, Pickering, Canada) et ont été transformés dans les bactéries électrocompétentes Stbl3 par un pulse de 1.80 kV. L'ADN plasmidique a été extrait à l'aide de la trousse « *QIAprep Spin Miniprep kit* » (Qiagen, Mississauga, Canada). Les clones ont été

identifiés par une digestion BstXI (Roche, Laval, Canada), ceux ayant intégrés les inserts shRNA ne pouvant pas être digérés par cette enzyme. Les clones potentiellement positifs ont ensuite été confirmés par une digestion BamHI (Roche, Laval, Canada) et XhoI (Roche, Laval, Canada).

3.2. Production des lentivirus

3.2.1. Préparation des ADNs et transfection

Les vecteurs lentiviraux (7,5 µg) shGATA4 #1, 2, 3 ou shEGFP pour le contrôle négatif, ont été mélangés à l'ADN lentiviral de chacun des gènes nécessaires (7,5 µg) à la formation des capsides virales (plp1, plp2, plpVSVG), pour un total de 30 µg d'ADN pour chacune des conditions expérimentales.

Les mélanges d'ADNs ont été transfectés par lipofection dans la lignée cellulaire 293T,ensemencée la veille dans des boîtes de pétri de 100 mm et dont la confluence est d'environ 90 % au moment de la transfection. Dans chacun des mélanges d'ADNs, 750 µl de milieu OptiMEM (Invitrogen, Burlington, Canada) ont été ajoutés. Aussi, pour chaque mélange d'ADN, 60 µl/puit de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) ont été pré-incubés avec 750 µl/puit du milieu OptiMEM, pendant 5 minutes à la température de la pièce. Suite à la pré-incubation, 750 µl du mélange Lipofectamine 2000/OptiMEM ont été ajoutés à chaque tube d'ADN/OptiMEM et l'incubation a été poursuivie pendant 20 minutes à la température de la pièce. Le milieu de culture des 293T a été remplacé par 5 ml de milieu OptiMEM, et 1,5 ml du mélange ADN/Lipofectamine 2000/OptiMEM ont été ajoutés goutte à goutte dans chaque boîte de pétri. Les cellules ont été incubées

pendant 4 heures à 37°C et le milieu OptiMEM a été remplacé par 7 ml de milieu DMEM enrichi de 10 % FBS. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37°C.

3.2.2. Récolte des virus

Le milieu de culture des cellules 293T transfectées, contenant les virus en suspension, a été prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml (BD Biosciences, Mississauga, Canada) et filtré sur un filtre de 0,45 µm. Les particules virales récoltées ont été aliquotées et conservées à -80°C.

3.3. Infection des cellules IEC-6/Cdx2

Les suspensions virales (750 µl) ont été dégelées à 37°C et 750 µl de polybrène (Sigma Aldrich, Missouri, USA) 4 µg/µl (concentration finale de 4 µg/ml) y ont été ajoutés. Ce mélange a ensuite été ajouté sur les cellules IEC-6/Cdx2, dont le milieu a été préalablement enlevé. Ces cellules ont été utilisées à environ 50 % de confluence, ou moins dans certaines circonstances spéciales (double infection) et elles ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits. Les cellules ont été incubées 1 heure à 37°C et 1 ml du milieu approprié à ces cellules (DMEM 5% FBS) additionné de 1 µl de polybrène 4 µg/µl a été ajouté à chacun des puits. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37°C puis elles ont été induites à la différenciation par ajout de 4 mM d'IPTG au milieu de culture (Fisher, Mississauga, Canada). L'incubation des cellules s'est poursuivie pour le temps désiré selon la cinétique (2 à 32 jours), puis elles ont été récoltées pour extraction de protéines totales et d'ARN.

4. Isolement des protéines et analyse western

4.1. Extraction de protéines totales de cellules

Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS 1X et récoltées dans du tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40 et 0,5 % Na-déoxycolate) auquel a été ajouté, juste avant l'extraction, 1 % du cocktail d'inhibiteurs de protéases (*protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*) (Sigma Aldrich, Missouri, USA), 200 mM d'orthovanadate et 50 mM de NaF. Les lysats cellulaires ont été incubés sur glace pendant 10 minutes et centrifugés à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les protéines totales ont été recueillies et conservées à -80°C. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la trousse *Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1* (Bio-Rad, Mississauga, Canada) en suivant les recommandations du manufacturier.

4.2. Extraction de protéines totales de tissus intestinaux murins

Suite au sacrifice des souris, l'intestin grêle et le côlon ont été prélevés. Le jéjunum, l'iléon et le côlon proximal ont été mis dans un tube eppendorf de 2 ml contenant 500 µl de tampon de lyse (section 4.1). Les tissus intestinaux ont été homogénéisés à l'aide d'un polytron (Brinkmann instruments, Canada) et les protéines totales ont été extraites comme décrit à la section 4.1

4.3. Immunobuvardage de type western

4.3.1. Préparation des échantillons de protéines, migration et transfert

Les différents échantillons de lysats protéiques (40 µg) ont été préparés dans le tampon de chargement (*LDS Sample Buffer*) contenant l'agent réducteur (*Sample Reducing Agent*) (Invitrogen, Burlington, Canada). Les échantillons ont ensuite été dénaturés en les chauffant à 70°C pendant 10 minutes. La migration des échantillons a été effectuée sur des gels prémoulés NuPage 4-12 % (Invitrogen, Burlington, Canada) pendant 1 heure à 200 volts dans un tampon MOPS pH 7,7 (50 mM MOPS, 50 mM Tris base, 0,1 % SDS et 1 mM EDTA). La masse moléculaire apparente des protéines a été déterminée par comparaison avec la migration d'un marqueur de masse moléculaire définie (*Rainbow Marker RPN 756*, Amersham Biosciences, Québec, Canada). Le transfert des protéines a été effectué sur une membrane de type PVDF (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada), pendant 1 heure à 30 volts dans le tampon de transfert pH 7,2 additionné d'antioxydant (Invitrogen, Burlington, Canada) (25 mM Bicine, 25 mM Bis-Tris et 1 mM EDTA).

4.3.2. Immunodétection des antigènes

Les sites antigéniques ont été bloqués à l'aide de blotto 10 % (lait écrémé Carnation dissout dans du tampon PBS-Tween 0,1 %) O/N à 4°C. Les membranes ont ensuite été incubées à TP en présence des anticorps primaires (Ac 1) dilués dans le blotto 10 % (voir Tableau 1 pour les dilutions d'anticorps et les temps d'incubation). Après deux lavages de 15 minutes dans du PBS-Tween 0,1 %, les membranes ont été

incubées pendant 45 minutes, à TP, avec l'anticorps secondaire (Ac 2), couplé à la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*, HRP), approprié (voir Tableau 1) et dilué dans le blotto 10 %. Les membranes ont été rincées trois fois dans du PBS-Tween 0,1 % pendant 15 minutes. La détection et la visualisation des signaux spécifiques, par autoradiographie de chimiluminescence, a été réalisée en utilisant la trousse ECL + et les films autoradiographiques ECL (Amersham Biosciences, Québec, Canada) selon les recommandations du fabricant.

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés lors de l'analyse des protéines par transfert western

Nom Ac 1	Nature	Dilution	Temps d'incubation	Nom Ac 2	Dilution
GATA4 (C-20) ⁽¹⁾	Polyclonal chèvre	1/500	2 heures	Donkey anti-goat ⁽¹⁾	1/3000
Cdx2 ⁽²⁾	Polyclonal lapin	1/20000	1 heure 30	Donkey anti-rabbit ⁽¹⁾	1/3000
PPAR γ (H-100) ⁽¹⁾	Polyclonal lapin	1/1000	2 heures	Donkey anti-rabbit ⁽¹⁾	1/3000
Actine (C-11) ⁽¹⁾	Polyclonal chèvre	1/3000	1 heure	Donkey anti-goat ⁽¹⁾	1/3000

Fournisseurs : (1) Santa Cruz, Californie, USA, (2) Fait maison (BOULANGER et al, 2005)

5. Extraction d'ARN total et analyse par PCR et Q-PCR

5.1. Extraction d'ARN totaux de cellules et de tissus

L'extraction de l'ARN total de cellules et de tissus a été effectuée selon le protocole *Totally RNA extract* (Ambion, Austin, USA) et les centrifugations ont été réalisées à 4°C, tel que recommandé par le fabricant.

Afin d'éliminer toutes traces d'ADN, l'ARN a été traité à la DNase en accord avec les recommandations du fabricant (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada). L'ARN a été dosé par spectrophotométrie (Biorad, Mississauga, Canada) et conservé à -80°C.

Pour les sections de jéjunum, d'iléon et de côlon, les tissus ont été ouverts longitudinalement et rincés avec du PBS 1X froid pour être ensuite placés dans 1 ml de *Denaturation Solution* et conservés à -80°C. Les échantillons ont été dégelés puis homogénéisés à l'aide d'un polytron (Brinkmann instruments, Canada) et l'extraction d'ARN a été faite tel que décrit précédemment.

5.2. Réaction de polymérisation en chaîne avec la transcriptase inverse (RT-PCR)

La synthèse des ADNc a été faite à partir de 1 µg d'ARN en utilisant la trousse *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* et selon les recommandations du fournisseur (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada). La réaction de transcription inverse a été effectuée pendant une heure à 42°C. Enfin, l'enzyme fut inactivée durant 5 minutes à 95°C.

Les séquences des amorces et les conditions d'amplification utilisées pour les réactions en chaîne de la polymérase (PCR), sont décrites au tableau 2 et dans les sections relatives à chaque expérience. Les produits de PCR ont été analysés en déposant 10 µl de ces produits sur un gel d'agarose 1 % (Sigma Aldrich, Missouri, USA) additionné de bromure d'éthidium (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canada)

pour être migrés par électrophorèse dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). La présence d'amplicons a été révélée sous illumination UV.

Tableau 2 : Amorces et amplification de gènes cibles de rat par RT-PCR

Gènes	Amorces	Tm °C	Protocole d'amplification
PAP III	5'-AAC AGA GGT GGA TGG GAG TG-3' (s)	59	1. Hot start à 94°C 2. Dénaturation initiale : 3 min à 94°C 3. 30 cycles : 45 sec à 94 °C 45 sec à Tm 90 sec à 72°C 4. Élongation terminale : 5 min à 72°C 5. 4°C, ∞
	5'-GAT CTT CCC ATT GGG GTT CT-3' (as)		
PAPI	5'-ACT CCA TGA CCC CAC TCT TG-3' (s)	59	
	5'-ATT TGC AGA CGT AGG GCA AC-3' (as)		
HPRT	5'-GGC CAT CTG CCT AGT AAA GCT-3' (s)	58	
	5'-GCT GGC CTA TAG GCT CAT AGT-3' (as)		

Légende : T_m : Température d'hybridation pour la paire d'amorces. *HPRT*, Hypoxanthine guanine phosphoribosyle transférase. (s) : oligonucléotide sens; (as) : oligonucléotide antisens.

5.3. PCR quantitatif en temps réel (Q-PCR)

La quantification par PCR en temps réel a été réalisée sur le *LightCycler v.1.5* (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Tous les ADNc utilisés comme échantillons ont été synthétisés tel que décrit précédemment (section 5.2) et dilués 1 : 1 dans de l'eau stérile exempte de RNase (QIAGEN, Mississauga, Canada). La synthèse des ADNc a été réalisée au même moment et avec un mélange réactionnel commun lorsque possible afin d'éviter les variations d'efficacité entre les réactions. Dans des capillaires de 20 µl (Roche Diagnostics, Laval, Canada), 2 µl de l'ADNc dilué 1 : 1 ont été mélangés avec 10 µl de *SYBR Green* (QIAGEN, Mississauga, Canada), 6 µl d'eau stérile exempte de RNase (QIAGEN, Mississauga, Canada) et 1 µl de chaque amorce, puis centrifugés 5 secondes à 2000 rpm. Les réactions ont débuté avec une

phase d'activation de 15 minutes à 95°C, puis une phase d'amplification de 50 cycles caractérisée par une dénaturation à 94°C pour 15 secondes suivit d'une hybridation à des températures variables (voir tableau 3) selon les gènes cibles pour 30 secondes et d'une élongation à 72°C pour 30 secondes avec lecture à la fin de la fluorescence à 530 nm. Après les réactions, une courbe de fusion a été réalisée par une augmentation de température en gradient de 0,2°C/seconde jusqu'à 95°C avec une lecture continue de la fluorescence. Les amorces utilisées et les températures d'hybridation correspondantes sont détaillées dans le tableau 3. Toutes les réactions ont été réalisées avec un contrôle négatif contenant de l'eau à la place des ADNc.

Tableau 3 : Amorces et amplification des gènes cibles par Q-PCR

Gènes	Amorces	T _m ^a
GATA4	5'-AAT GCG GAA GGA GGG GAT T-3' (s) 5'-GGA GCT GCT GTG CCC ATA GT-3' (as)	59°C
PAPI	5'-ACT CCA TGA CCC CAC TCT TG-3' (s) 5'-ATT TGC AGA CGT AGG GCA AC-3' (as)	59°C
HPRT	5'-GGC CAT CTG CCT AGT AAA GCT-3' (s) 5'-GCT GGC CTA TAG GCT CAT AGT-3' (as)	59°C
TBP	5'-AGC CCT CCA CCT TAT GCT CA-3' (s) 5'-TGT GTG GGT TGC TGA GAT GT-3' (as)	59°C

Légende : ^a Température d'hybridation pour la paire d'amorces. *HPRT*, Hypoxanthine guanine phosphoribosyle transférase, *TBP*, TATA-binding protein. (s) : oligonucléotide sens; (as) : oligonucléotide antisens.

Un échantillon parmi les ADNc de cellules IEC-6/Cdx2 a été dilué 1 : 1, 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100 et 1 : 500 dans de l'eau stérile exempte de RNase afin de servir de calibrateur pour comparer les résultats entre les différentes réactions de Q-PCR. Une dilution de cet échantillon a été incluse dans chacune des réactions d'amplification. L'efficacité des amorces a été analysée à la température optimale d'amplification avec les dilutions 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100 du calibrateur par Q-PCR tel que décrit précédemment.

Chaque gène cible a été mesuré en duplicata pour les échantillons d'ADNc et une courbe standard en triplicata a été réalisée à partir des dilutions du calibrateur. La quantification relative a été réalisée avec le logiciel LCS4 v.4.0.0.23 (Roche Diagnostics, Laval, Canada) à partir des données du calibrateur inclus dans chaque réaction et de l'efficacité de la courbe standard pour normaliser les résultats. L'expression relative a été obtenue en comparant l'expression des gènes cibles à celui du gène de référence, HPRT ou TBP selon les expériences.

6. Analyse par micro-puces à l'ADN (Affymetrix)

Trois cultures IEC-6/Cdx2 shGATA4 et plenti vide ont été effectuées tel que décrit précédemment (section 3.3). Les cellules ont été induites à la différenciation 2 jours après l'infection, par ajout d'IPTG 4mM (Fisher, Mississauga, Canada) au milieu de culture, et elles ont été récoltées 4 jours après l'infection. Les ARNs ont été extraits tel que décrit précédemment (section 5.1) et ils ont été envoyés à la plate-forme de micro-puces à ADN du Centre d'Innovation Génome Québec à l'Université McGill pour réaliser le criblage de micro-puces à ADN. Brièvement, les ARNs ont été convertis en ADNc par transcriptase inverse pour être utilisés pour la synthèse *in vitro* de sondes d'ARNc marquées à la biotine. Les sondes d'ARNc ont ensuite été hybridées sur des puces *Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0* individuelles, colorées à la streptavidine-phycoérythrine et analysées avec un module de criblage *GeneArray* à une longueur d'onde de 488nm. Les résultats ont été analysés avec le logiciel de la plate-forme de micro-puces à ADN en utilisant seulement les gènes dont

la fluorescence varie d'une façon significative ($p \leq 0,05$) de 2 fois et plus avec une différence d'intensité minimale de 200 unités de fluorescence.

7. Clonage pBabepuro/mutG4

7.1. Mutagenèse par PCR du cDNA de GATA4

La mutagenèse dirigée du cDNA complet de GATA4 a été réalisée en deux étapes d'amplification PCR en utilisant la polymérase *HotStart PFU Ultra polymerase* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Californie). La première étape a permis d'amplifier la portion 5' du cDNA de GATA4 en intégrant les 6 mutations ponctuelles, ainsi que la portion 3' en intégrant encore une fois les 6 mutations ponctuelles. Ces amplifications ont été réalisées respectivement avec les amorces up-1 (5'-GGC CCC ACA ATT AAC GCA TTC ACG TCC TTC TGA GAA GTC-3') et dw-1 (5'-TTG TCT GCC TCG TGC TCA GA-3') ainsi que up-2 (5'-CCG AGC AGG AAT TTG AAG AG-3') et dw-2 (5'-GAC TTC TCA GAA GGA CGT GAA TGC GTT AAT TGT GGG GCC-3') (Fig. 15a). L'amplification a été réalisée comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes ; 30 cycles d'incubation alternative de 60 sec à 94°C, 90 sec à 59,9°C (amorces up-1, dw-1) et à 55°C (amorces up-2, dw-2) et 90 sec à 72°C; et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été migrés sur un gel d'agarose de 1 %, puis les bandes correspondantes aux amplifications désirées ont été excisées. L'ADN a été élué de l'agarose en centrifugeant les bandes excisées sur 0,5 cm de laine minérale entassée dans le fond d'un tube percé, lui-même déposé dans un second tube, pendant 30 secondes à vitesse maximale.

La deuxième étape de mutagénèse a permis d'amplifier le cDNA complet de GATA4 ayant intégré les 6 mutations ponctuelles. Cette amplification a été réalisée en utilisant les amorces up-2 et dw-1 et 1 µl de chacun des produits de PCR purifié de la première étape. Le mélange réactionnel de l'amplification était composé de la même façon que pour la première étape. L'amplification a été réalisée avec le même protocole que la première étape, avec cette fois un Tm de 57,9°C.

7.2. Sous-clonage du cDNA GATA4 muté dans le vecteur de transition TOPO et transfert dans le vecteur pBabepuro

Le produit de PCR obtenu de la deuxième étape de mutagénèse dirigée a été inséré dans le vecteur *pCR Blunt II TOPO* à l'aide du « *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* » (Invitrogen, Burlington, Canada) selon les recommandations du manufacturier. L'intégrité de l'insert a été validée par séquençage au Centre d'innovation Génome Québec à l'Université McGill en utilisant les amorces SP6 et T7 et la construction a été nommée TOPOblunt/mutG4full. L'insert mutG4full a été sous-cloné dans le vecteur rétroviral pBabepuro, dans le site EcoRI (Roche, Laval, Canada), grâce à une ligation concentrée des extrémités cohésives de l'insert et du vecteur par l'enzyme *T4 DNA ligase* (New England Biolabs, Pickering, Ontario). La ligation a été transformée dans les bactéries chimiquement compétentes Stbl3. Le sens des inserts a été déterminé par digestion enzymatique à l'aide de l'enzyme NotI (Roche, Laval, Canada), qui possède un site de digestion dans l'insert et deux dans le vecteur pBabepuro. L'intégrité des inserts sens a été validée par séquençage au Centre d'innovation Génome Québec à l'Université McGill par les amorces externes (dw-1,

up-2) ayant servies à la mutagenèse dirigée. La construction a été nommée pBabepuro/mutG4full.

7.3. Expérience de « récupération » de GATA4

L'ADN rétroviral (15 µg) contenant les gènes nécessaires à la formation des capsides virales (gag, pol et env) et l'ADN des vecteurs rétroviraux pBabepuro/mutG4full ou pBabepuro vide (15 µg) ont été utilisés pour produire les rétrovirus utilisés pour l'expérience de « récupération » de GATA4. Les méthodes utilisées pour la production des virus et l'infection des cellules IEC-6/Cdx2 sont les mêmes que celles décrites aux sections 3.2 et 3.3.

8. Activité de liaison du facteur de transcription GATA4 au promoteur du gène PAPI

8.1. Production de protéines GATA4 *in cellulo*

Les constructions pcDNA/GATA4 et pcDNA (30 µg de chaque) ont été utilisées pour transfecter des cellules 293T, tel que décrit à la section 3.2.1.

8.2. Extraction des protéines nucléaires des cellules

Les trois tampons utilisés dans ce protocole : tampon hypotonique (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM), tampon à faible concentration de sels (HEPES 20 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 0,02 mM, glycérol 25 %, EDTA 0,2 mM) et tampon à forte concentration de sels (HEPES 20 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 1,2 M, glycérol 25 %, EDTA 0,2 mM).

EDTA 0,2 mM) sont additionnés, juste avant leur utilisation, de DTT 1M (0,5 µl/ml) et de 1 % du cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma Aldrich, Missouri, USA).

Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS 1X. Elles ont été récoltées dans 4 ml de tampon PBS 1X et transférées dans un tube conique de 15 ml pour une centrifugation à 1800 x g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots de cellules ont doucement été resuspendus dans 5 volumes de tampon hypotonique. Les resuspensions ont été transférées dans des eppendorfs et centrifugées à 850 x g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots de cellules ont été resuspendus dans 3 volumes de tampon hypotonique et incubés sur glace pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été homogénéisées dans les eppendorfs en donnant 20 coups avec un pilon de grosseur approprié et centrifugées à 1200 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant, qui contient les protéines cytoplasmiques, a été retiré et 0,5 volume de tampon faible en sels a été ajouté, 2 gouttes à la fois, en resuspendant le culot entre chaque ajout. Ensuite, 0,5 volume de tampon fort en sels a été ajouté de la même façon. Les suspensions ont été agitées à 4°C pendant 30 minutes puis centrifugées à 17000 x g pendant 30 secondes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires a été prélevé et conservé à -80°C. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la trousse *Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1* (Bio-Rad, Mississauga, Canada) en suivant les recommandations du manufacturier.

8.3. Préparation des oligonucléotides pour les sondes radioactives

Les 7 paires d'oligonucléotides complémentaires, correspondant aux 8 sites de liaison du facteur GATA4 dans la région de 1260 pb en amont du site d'initiation de la

transcription du gène PAPI de rat, ont d'abord été synthétisés (IDT, Coralville, USA) (Tableau 4). 25 µg de chaque oligonucléotide ont été mélangés et le volume a été complété à 50 µl avec de l'eau stérile. Les oligonucléotides ont été chauffés pendant 2 minutes à 75°C et la réaction d'appariement a été effectuée en laissant descendre la température jusqu'à la température de la pièce. Les oligonucléotides doubles brins ont été dilués à 100 ng/µl puis marqués radioactivement à leur extrémité 5' dans une réaction d'échange du groupement phosphate avec le [γ -³²P] dATP par la *T4 polynucléotide kinase* (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Les sondes ont été purifiées en utilisant les colonnes *ProbeQuantTM G50* (Amersham Biosciences, Québec, Canada) selon le protocole du manufacturier.

Tableau 4 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le gel de rétention

# sonde	Région du promoteur PAPI ciblée	Site GATA correspondant	Séquence
1	-1071 à -1052pb	I	TCT CTC TGA TCT TGC TTT GA
2	-1059 à -1040pb	II	TGC TTT GAG ATA GGC TGC TA
3	-734 à -715pb	III-IV	TCC TAT GAG ATC TCA GTC TG
4	-562 à -543pb	V	TTA CAA AAT GAT ATG AAG CT
5	-549 à -530pb	VI	TGA AGC TTT ATC AAC ATA TC
6	-353 à -334pb	VII	TCT TAA CTT ATC AGG TAA TA
7	-175 à -156pb	VIII	ATG ACA ATT ATC AGT TGT TA

8.4. Réaction de liaison à l'ADN et gel de rétention

Les réactions de liaison à l'ADN ont été effectuées dans un volume total de 20 µl contenant 5 µg d'extraits de protéines nucléaires (pcDNA, pcDNA/GATA4), 4 µl de tampon de liaison 5X (1 M Tris-Cl pH 7.5, 1 M MgCl₂, 3 M KCl, 0,5 M EDTA et 1 M de DTT) et 1 µg de compétiteurs non spécifiques dIdC (Amersham Biosciences,

Québec, Canada). 330 ng de la sonde (50 000 cpm) ont été ajoutés aux réactions et elles ont été incubées pendant 20 minutes à la température de la pièce. Les mélanges réactionnels ont été déposés sur un gel 5 % acrylamide (4,8 g d'acrylamide, 0,128 g de bis-acrylamide, 9 ml de TBE 5X (0,04 M Tris-borate, 0,04 M acide borique, 0,5 M EDTA pH 8.0), 200 µl d'ammonium persulfate 10 %, 100 µl de TEMED et 80 ml d'eau distillée) préalablement équilibré pendant 15 minutes à 25 mA dans un tampon TBE 0,5X. Le gel a été migré pendant 60 minutes à 25 mA puis il a été séché pendant 1 h 30 min à 80°C avant d'être exposé dans une cassette d'exposition (*Kodak screen*) (Biorad, Mississauga, Canada) O/N. L'écran a été révélé le lendemain à l'aide de l'appareil *Molecular Imager FX* (Biorad, Mississauga, Canada).

9. Préparation des constructions pGL3 basic/promoteur PAPI

9.1. Extraction de l'ADN génomique des cellules IEC-6 et réaction PCR

L'ADN génomique des cellules IEC-6 a été extrait en utilisant les colonnes QIAGEN (QIAGEN, Mississauga, Canada) et selon la méthode décrite par le manufacturier. La région promotrice de 1260 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène PAPI de rat a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de cellule IEC-6 et des amorces RPAPI prom up (5'-CTG CAG ATT TTC CAG TTA GTC-3') et RPAPI prom dw (5'-GTG AGG ACA GAG ATG GCT GT-3'). L'amplification a été réalisée avec la polymérase *HotStart PFU Ultra* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Californie) et 100 ng d'ADN génomique des cellules IEC-6. Le mélange réactionnel utilisé comportait les mêmes composants et les mêmes proportions que celui décrit dans la section 7.1. L'amplification a été réalisée comme suit : 1 cycle de dénaturation

initiale à 94°C pendant 2 minutes ; 30 cycles d'incubation alternative de 1 minute à 94°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C; et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. La réaction a finalement été refroidie à 4°C.

9.2. Sous-clonage de la région promotrice de PAPI dans le vecteur de transition TOPO

Le produit de PCR obtenu par l'amplification de la région promotrice de PAPI à partir de l'ADN génomique de cellules IEC-6 (section précédente 9.1) a été inséré dans le vecteur de transition *pCR Blunt II TOPO* à l'aide du « *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* » (Invitrogen, Burlington, Canada). L'intégrité de l'insert a été validée par séquençage au Centre d'innovation Génome Québec à l'Université McGill par les amorces SP6 et T7 et la construction a été nommée TOPO blunt/promoteur PAPI.

9.3. Amplification des différents fragments du promoteur du gène PAPI

Cinq fragments différents du promoteur du gène PAPI de rat ont été amplifiés à partir de la construction TOPO blunt/promoteur PAPI pour créer les cinq constructions utilisées lors des essais luciférase (#1 à 5, voir Fig. 17). Les sites pour les enzymes de restriction *MluI* (5'-ACGCGT-3') et *XhoI* (5'-CTCGAG-3') ont été ajoutés respectivement à l'extrémité 5' et 3' de chaque fragment, pour permettre le clonage successif dans le vecteur luciférase pGL3basic. Les séquences des amorces utilisées pour les amplifications des 5 fragments sont regroupées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification des 5 fragments du promoteur PAPI

# construction	Amorces utilisées	Séquences
1 (-1260 à +1)	R-pPAPI full MluI-5'	5'-TCACTA ACGCGT CTG CAG ATT TTC CAG TTA GTC-3' (s)
	R-pPAPI full XhoI-3'	5'-TAGTGA CTCGAG GTG AGG ACA GAG ATG GCT GT-3' (as)
2 (-682 à -83)	R-pPAPI-Mlu-1	5'-TCACTA ACGCGT ACC AAG CTG GAC AGA GGA CA-3' (s)
	R-pPAPI-Xho-t	5'-TAGTGA CTCGAG AGG ATG ATG GGA AGC ACT TG-3' (as)
3 (-541 à -83)	R-pPAPI-Mlu-2	5'-TCACTA ACGCGT GAA GCT TTA TCA ACA TAT C-3' (s)
	R-pPAPI-Xho-t	<i>voir construction 2(as)</i>
4 (-423 à -83)	R-pPAPI-Mlu-3	5'-TCACTA ACGCGT CTT CCA GAT GAA TTT CAA GC-3' (s)
	R-pPAPI-Xho-t	<i>voir construction 2(as)</i>
5 (-199 à -83)	R-pPAPI-Mlu-4	5'-TCACTA ACGCGT CAG GGC TGC TAA CAG GAA AG-3' (s)
	R-pPAPI-Xho-t	<i>voir construction 2(as)</i>

(s) : oligonucléotide sens; (as) : oligonucléotide antisens.

L'amplification a été réalisée avec la polymérase HotStart PFU Ultra Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Californie) et 50 ng d'ADN de la construction TOPO blunt/promoteur PAPI. Le mélange réactionnel utilisé comportait les mêmes composants et les mêmes proportions que celui décrit dans la section 7.1. L'amplification a été réalisée comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes ; 35 cycles d'incubation alternative de 1 minute à 94°C, 1 minute à 62°C et 1 minute 30 secondes à 72°C; et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. La réaction a finalement été refroidie à 4°C.

9.4. Clonage des fragments amplifiés du promoteur du gène PAPI dans le vecteur luciférase pGL3basic

Les 5 fragments du promoteur du gène PAPI amplifiés précédemment (voir section précédente 9.3) ont été purifiés à l'aide de la trousse « *Montage PCR Centrifugal Filter Devices* » (Millipore Corporation, Bedford, USA) selon les recommandations du fournisseur. Les produits de PCR purifiés ainsi que le vecteur luciférase pGL3basic ont été digérés avec les enzymes de restriction MluI (Roche, Laval, Canada) et XhoI (Roche, Laval, Canada). Les fragments du promoteur de PAPI ont été insérés dans le vecteur pGL3basic grâce à une ligation concentrée des extrémités cohésives des fragments et du vecteur par l'enzyme *T4 DNA ligase* (New England Biolabs, Pickering, Canada). La ligation a été transformée dans les bactéries chimiquement compétentes TOP10 selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen, Burlington, Canada). L'intégrité des inserts a été validée par séquençage au Centre d'innovation Génome Québec à l'Université McGill par les amorces ayant servies à l'amplification des différents fragments de promoteur. Les constructions ont été nommées pGL3basic/prom.PAPI #1 à 5.

10. Essais luciférases

10.1. Préparation des cellules

Les cellules Caco-2/15 ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits afin d'être à environ 90-95 % de confluence le jour de la transfection. Chaque condition fut évaluée en triplicata.

10.2. Transfection transitoire

10.2.1. Préparation des ADNs

Un total de 0,8 µg d'ADN par puits a été transfecté dont : 0,2 µg des différents vecteurs luciférase pGL3basic/prom.PAPI #1 à 5 ; 0, 100, 200 ou 400 ng du vecteur d'expression pcDNA/GATA4 et/ou 25, 50 ng du vecteur d'expression CMV-Cdx2 ; et une quantité complémentaire du vecteur pcDNA 3.1néo afin de compléter à 0,8 µg. Le vecteur pRL SV40-Rénilla (0,6 ng) (Proméga, Madison, USA) a été ajouté à chaque mélange d'ADN pour évaluer l'efficacité de transfection dans chacun des puits. Les ADNs sont préparés en triplicata dans un même tube.

10.2.2. La transfection

Le milieu de culture des cellules Caco-2/15 a été remplacé par 500 µl/puit d'OptiMEM (Gibco BRL, Burlington, Canada) environ 1 heure avant les cotransfections des cellules. La méthode utilisée pour la transfection est essentiellement la même que celle décrite précédemment dans la section 3.2.1, à la différence que les quantités de Lipofectamine 2000 et d'ADN ont été adaptées à la superficie des puits.

10.3. Lyse des cellules et essai luciférase

Après 48 heures, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées dans 500 µl de PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ et 2 mM de KH₂PO₄). Les cellules ont ensuite été lysées dans 100 µl de tampon de lyse passive 1X (PLB : *passive lysis buffer*) (Proméga, Madison, USA) et agitées sur plaque agitatrice pendant 15 à 30 minutes. Les lysats de cellules ont été resuspendus 5 fois, transférés

dans un eppendorf et centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 13 000 rpm. Un volume de 20 µl d'extraits protéiques a été utilisé pour la lecture, le restant a été conservé à -80°C. La solution contenant le substrat pour la luciférase firefly (LAR II : *Luciferase Assay Substrate*) (Proméga, Madison, USA) ainsi que le tampon *Stop'n'Glow* (Proméga, Madison, USA) contenant le substrat pour la luciférase rénilla ont été préparés, selon les recommandations du fournisseur. L'activité luciférase a immédiatement été mesurée de façon automatique par l'utilisation du luminomètre de marque *Microplate Luminometer ORION* (Berthold Detection Systems) selon le protocole suivant : première injection de 50 µl du substrat pour la luciférase firefly (LAR II) suivit d'un délai de trois secondes ; la première mesure a été prise pendant dix secondes suivit d'un délai de dix secondes. Il y a ensuite eu injection de 50 µl du substrat pour la luciférase rénilla (tampon *Stop'n'Glow*), délai de trois secondes puis la deuxième mesure a été prise pendant dix secondes. Les niveaux d'expression des facteurs de transcription à l'essai ont été vérifiés par immunobuvardage de type western, en combinant 5 µl de chacun des extraits protéiques des triplicatas.

11. Génération modèle murin d'expression ectopique de GATA4

Les souris 12.4KbVilCre possèdent l'ADNc de la Cre recombinase sous le contrôle d'une portion de 12,4 Kb du promoteur de la villine qui permet l'expression de la Cre recombinase spécifiquement au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon proximal à partir du jour E12,5 (MADISON et al, 2002).

Les souris loxP.STOP.loxP-GATA4, que nous voulions créer, contiennent dans leur génome un transgène d'expression de GATA4 sous le contrôle du promoteur CMV.

Figure 9. Séquences loxP et recombinaison intermoléculaire

A) Schéma de la séquence d'un élément loxP. Un site loxP (*locus of X-ing over*) est constitué de deux séquences inversées répétées de 13 pb séparées par une région asymétrique de 8 pb responsable de la directionnalité du site loxP. La protéine Cre, une recombinase de 38 kDa provenant du bactériophage P1, médie la recombinaison intra et intermoléculaire spécifique entre des sites loxP (SAUER, 1993). La recombinaison se produit dans la région asymétrique.

B) Schéma du vecteur pBS302. La cassette loxP.STOP.loxP (1.6 kb) utilisée pour la génération de notre souris transgénique, provient du vecteur pBS302 (Life Technologies). La région STOP contient trois éléments qui permettent l'interruption de la transcription, soit : 1) un signal de polyadénylation de 825 pb (SV40), qui dicte l'arrêt de transcription, 2) un espaceur de 550 pb dérivé de la séquence C-terminale du gène *HIS3* de levure (*his3-ded1*), et 3) un oligonucléotide synthétique où l'ATG est un faux signal d'initiation de la traduction et où la séquence GTAAGT est un site 5' donneur d'épissage.

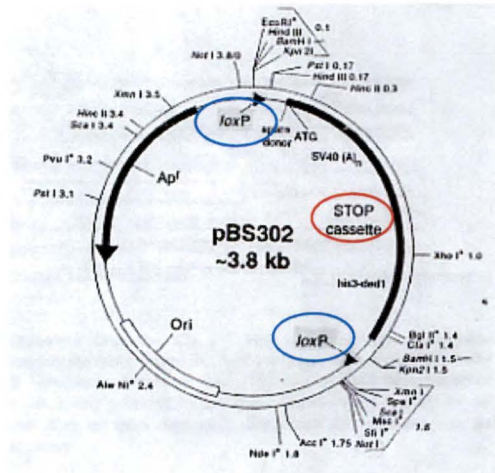
C) Processus de recombinaison intermoléculaire. Des souriceaux nés du croisement entre les souris VilCre et loxP.STOP.loxP-GATA4, certains possèdent les deux constructions. Dans ces animaux, l'expression de la protéine Cre est sous le contrôle du promoteur villine, spécifique de l'épithélium intestinal. Il est donc possible, chez ces souris doubles transgéniques, qu'il y ait recombinaison des séquences loxP, via la Cre, menant à l'expression ectopique de la protéine GATA4 dans l'épithélium intestinal grêle et colique.

A

loxP (locus of X-ing over P1)

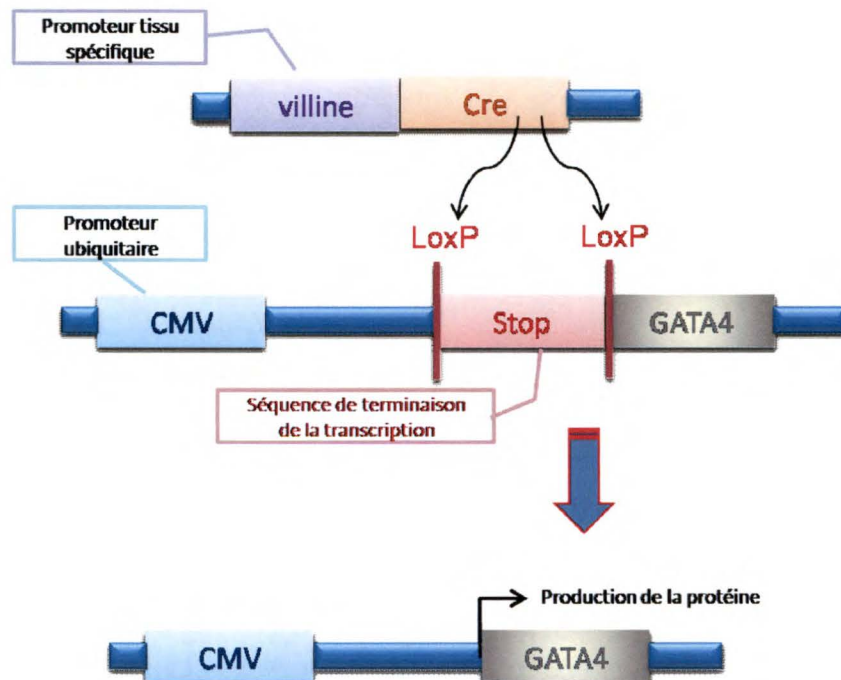
ATAACTTCGTATA **ATGTATGC** TATACGAAGTTAT
 inverted repeat Spacer inverted repeat

B



Life Technologies

C



Le promoteur CMV (*human cytomegalovirus major immediate-early promoter/enhancer*) provient du cytomégalo virus, un pathogène membre du groupe des virus herpès. Il est considéré comme étant l'un des promoteurs les plus forts *in vitro* (BOSHART et al, 1985). Entre le promoteur et l'ADNc de GATA4, il y a une cassette d'interruption de la transcription (STOP) flanquée de deux séquences loxP (Fig. 9a), provenant du plasmide pBS302 (Fig. 9b). La recombinaison des séquences loxP par la Cre recombinase engendre l'excision de la cassette STOP et permet la transcription du gène ectopique GATA4 spécifiquement dans l'épithélium intestinal grêle et colique (Fig. 9c).

Le croisement des deux souris peut mener à la génération d'une souris transgénique, selon les proportions mendéliennes, où la recombinaison des séquences loxP est possible dans le tissu épithélial intestinal, menant, théoriquement, à l'expression de GATA4 autant au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle que du côlon proximal (Fig. 22c).

11.1. Clonage de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4

11.1.1. Sous-clonage de la cassette loxP.STOP.loxP dans le vecteur de transition TOPO et transfert dans le vecteur plenti5V5adapteur/GATA4

La cassette loxP.STOP.loxP, provenant du vecteur pBS302 (Life Technologies), a été amplifiée avec des amorces permettant l'insertion d'un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction SpeI en 5' de la cassette (LOXSTOPUPSPEI: 5'-GC ACTAGT GCG GCC GCA CGT CTA AGA AAC-3' et LOXSTOPDW: 5'-CGG

CCG CAA TGG CCA GTA CTG-3'). L'amplification a été réalisée avec la polymérase *HotStart PFU Ultra* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Californie) et 100 ng d'ADN de la construction pBS302. Le mélange réactionnel utilisé comportait les mêmes composants et les mêmes proportions que celui décrit dans la section 7.1. L'amplification a été réalisée comme suit : 1 cycle de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes; 30 cycles d'incubation alternative de 1 minute à 94°C, 1 minute à 65°C et 1 minute à 72°C; et une élongation finale de 10 minutes à 72°C. La réaction a finalement été refroidie à 4°C. Le produit de PCR obtenu par l'amplification de la cassette loxP.STOP.loxP a été inséré dans le vecteur de transition *pCR Blunt II TOPO* à l'aide du « *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit* » (Invitrogen, Burlington, Canada).

La construction TOPOblunt/loxP.STOP.loxP a été digérée par l'enzyme de restriction *SpeI* (Roche, Laval, Canada). Le produit de digestion a été migré sur un gel d'agarose 1 %, la bande correspondant à l'insert (à 1,6 kb) a été isolée puis l'insert a été purifié par la trousse « *QUIAEX II Gel Extraction Kit* » (QIAGEN, Mississauga, Canada) selon les recommandations du fournisseur.

La construction plenti5V5adapteur/GATA4, dont le cDNA de GATA4 a été cloné en *EcoRI*, a été linéarisée par digestion avec l'enzyme de restriction *SpeI* (Roche, Laval, Canada). Le vecteur ouvert a été par la suite déphosphorylé pendant 30 minutes à 37°C avec la phosphatase alcaline (Roche Diagnostics GmbH, Québec, Canada).

L'insert loxP.STOP.loxP a été inséré dans le vecteur plenti5V5adapteur/GATA4 digéré grâce à une ligation concentrée des extrémités cohésives de l'insert et du vecteur par l'enzyme *T4 DNA ligase* (New England Biolabs, Pickering, Ontario). La

ligation a été transformée dans les bactéries chimiquement compétentes Stbl3. Le sens des inserts a été déterminé par digestion avec l'enzyme de restriction XhoI (Roche, Laval, Canada).

11.2. Validité de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4

La production de protéine GATA4, en culture cellulaire, par la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 seulement en présence de la recombinaise Cre a été validée. Pour ce faire, les cellules 293T,ensemencées dans des plaques 6 puits, ont été cotransfectées avec les ADNs des constructions CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 et plentiCre. La méthode de transfection utilisée est essentiellement la même que celle décrite précédemment dans la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, à la différence que les quantités de Lipofectamine 2000 et d'ADN ont été adaptées à la superficie des puits.

11.3. Génération de souris transgéniques loxP.STOP.loxP-GATA4 et croisements avec les souris VilCre

L'ADN de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 a été digéré par les enzymes de restriction KpnI et SphI (Roche, Laval, Canada). Ces digestions ont été réalisées pour linéariser la construction et minimiser la taille de l'ADN qui sera utilisé pour la microinjection dans des ovocytes de souris. Le produit de digestion a été migré sur un gel d'agarose 1 % et la bande d'environ 6000 pb correspondant à la région CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 a été excisée. L'ADN a été élué du gel d'agarose par électroélution à 80 volts pendant 1 heure, puis purifié sur une colonne « *Wizard DNA Clean-Up System* » (Promega, San Luis Obispo, USA) selon le

protocole du fournisseur. L'ADN a été dosé par spectrophotométrie et son intégrité a été vérifiée sur gel. L'ADN (2 µg) a été envoyé à l'IRIC-Institut de recherche en immunologie et en oncologie de Montréal (plate-forme financée par le RRTQ-Réseau de recherche en transgénèse du Québec) pour microinjection d'ovocytes de souris non-fécondés.

Cent souris (#580-679) sont nées suite à l'implantation des ovocytes microinjectés avec l'ADN CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4. La souris positive loxP.STOP.loxP-GATA4 (#600, mâle) a été croisée avec des souris VilCre (MADISON et al, 2002).

Les expérimentations faites avec les souris résultantes des croisements ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'Université de Sherbrooke en accord avec les normes en vigueur au Conseil Canadien de Protection des Animaux. Les souris ont été anesthésiées avec 300 µg/g de Kétamine et 40 µg/g de Xylazine avant d'être sacrifiées par dislocation cervicale. Au niveau de l'intestin grêle, le jéjunum et l'iléon ont été prélevés ainsi que le côlon proximal. Des extractions de protéines et d'ARN ont été effectuées (tel que décrit dans les sections respectives 4.2 et 5.1). Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR sont décrites dans le tableau 6.

Les mélanges réactionnels et le protocole d'amplification sont les mêmes que ceux décrits pour l'amplification de la Cre (section 11.4.1).

Tableau 6 : Amorces et amplification des gènes cibles murins par RT-PCR

Gènes	Amorces	Tm°
GATA4 (G4m) ^a	5'-AAT GCG GAA GGA GGG GAT T-3' (s) 5'-GGA GCT GCT GTG CCC ATA GT-3' (as)	59°C
GATA4 (gntV5) ^b	5'-CGG GTT GTT CAA ACA CCT TT-3' (s) 5'-ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT-3' (as)	56°C
HPRT	5'-GGC CAT CTG CCT AGT AAA GCT-3' (s) 5'-GCT GGC CTA TAG GCT CAT AGT-3' (as)	59°C

Légende : ^a Amorces qui amplifient l'ARNm provenant de GATA4 génomique et ectopique, ^b Amorces qui amplifient spécifiquement l'ARNm provenant de GATA4 ectopique en s'hybridant dans la portion 3' de GATA4 et dans l'épitope V5, qui provient du vecteur plenti5V5adapteur, en aval de GATA4. (s) : oligonucléotide sens; (as) : oligonucléotide antisens.

11.4. Génotypage

Deux méthodes de génotypage ont été utilisées pour caractériser les souriceaux nés de l'implantation d'ovocytes microinjectés et ceux résultants du croisement de la souris #600 avec les souris VilCre. Il s'agit de la méthode par PCR et de la méthode par Southern. Dans les deux cas, l'ADN génomique des souris a été extrait à partir de 0,5 cm de queue en utilisant le « *Spin Doctor Genomic DNA isolation kit* » (GerardBiotech, Oxford, USA).

11.4.1. Par PCR

Cette méthode a permis d'amplifier par PCR une région spécifique, correspondant à une portion de la construction intégrée (CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 ou VilCre) dans le génome des souris étudiées.

Dans le cas de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4, deux séries d'amorces ont été utilisées. Les amorces G4gnt2 (voir Tableau 7) s'hybrident dans la région 3' de GATA4 et en aval du cDNA de GATA4 de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-

GATA4. Les amorces G4gnt8 (voir Tableau 7) s'hybrident dans la séquence du promoteur CMV et dans le 1^{er} loxP de la cassette d'interruption de la transcription.

Les amorces utilisées pour détecter la construction villine-Cre sont les suivantes : Cre3 et Cre5 (voir Tableau 7).

Les mélanges réactionnels ont été préparés comme suit : pour la *Taq polymerase NEB* (New England BioLabs, Pickering, Canada), 0,5 µl d'ADN génomique de queue de souris ont été utilisés avec 2 µl de tampon *ThermoPol buffer* (New England BioLabs, Pickering, Canada), 0,16 µl d'un mélange de dNTP (25mM), 25 ng de chacune des amorces G4gnt-2, de l'eau bidistillée stérile pour compléter le volume final à 20 µl et finalement de 1,0 U d'enzyme. Dans le cas de la Taq maison, le mélange réactionnel de l'amplification était composé de 0,5 µl d'ADN génomique de queue de souris, de 2 µl de tampon *ThermoPol buffer* (New England BioLabs, Pickering, Ontario, Canada), de 0,16 µl d'un mélange de dNTP (25 mM), de 4,3 ng de chacune des amorces Cre, d'eau bidistillée stérile pour compléter le volume final à 20 µl et finalement de 0,8 µl de polymérase Taq faite maison. Dans le cas de la *Tfi DNA Polymerase* (Invitrogen, Burlington, Canada), un microlitre d'ADN génomique de queue de souris a été utilisé et le mélange réactionnel a été préparé selon les recommandations du fournisseur.

Tableau 7 : Génotypage par PCR, amorces et conditions d'amplification

Noms amorces	Séquences	Pol.	Tm
G4gnt2-up G4gnt2-dw	5'- CAC TCG ACG GGG CCT CTA -3' 5'- TCC TGA AGA ACA ACT GGG TAG AA -3'	<i>Taq</i> <i>polymerase</i> <i>NEB</i>	58°C
	1. Hot start à 94°C 2. Dénaturation initiale : 3 min à 94°C 3. 40 cycles : 45 sec à 94 °C 45 sec à Tm 90 sec à 72°C 4. Élongation terminale : 5 min à 72°C 5. 4°C, ∞		
G4gnt8-up G4gnt8-dw	5'- ATC CAC GCT GTT TTG ACC TC -3' 5'- GGT CGA GGG ACC TAA TAA CT -3'	<i>Tfi DNA</i> <i>polymerase</i>	54°C
	1. Hot start à 94°C 2. Dénaturation initiale : 2 min à 94°C 3. 40 cycles : 30 sec à 94 °C 30 sec à Tm 30 sec à 72°C 4. Élongation terminale : 5 min à 72°C 5. 4°C, ∞		
Cre3 Cre5	5'- CGT TCA CCG GCA TCA ACG TTT -3' 5'- GCG GCA TGG TGC AAG TTG AAT -3'	Taq maison	55°C
	Protocole d'amplification : voir G4gnt8		

Légende : Pol : polymérase utilisée. Tm : Température d'hybridation pour la paire d'amorces.

11.4.2. Par Southern

Par PCR, il a été possible d'identifier que 21 souris, parmi les 100 nées suite à l'implantation des ovocytes microinjectés, avaient intégré la construction d'intérêt. L'ADN génomique de ces 21 souris a été analysé par Southern pour déterminer lesquelles possédaient le plus grand nombre de copies de la construction.

I. Préparation sonde

La sonde a été préparée à partir de l'amplification de la cassette loxP.STOP.loxP du vecteur pBS302, en utilisant les amorces qui ont servi au clonage de la cassette dans

le vecteur *TOPO blunt* (LOXSTOPUPSPEI et LOXSTOPDW). L'amplification a été réalisée avec la polymérase *HotStart PFU Ultra* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Californie) et 100 ng d'ADN du vecteur pBS302. Le mélange réactionnel utilisé comportait les mêmes composants et les mêmes proportions que celui décrit dans la section 7.1. Le protocole d'amplification utilisé est le même que celui décrit à la section 11.1.1.

50 ng d'ADN amplifié et purifié par un tamisage sur laine minérale, tel que décrit à la section 7.1, ont été utilisés pour réaliser la sonde radioactive, en utilisant la trousse « *Rediprime II DNA Labeling system* » (Amersham Biosciences, Piscataway, USA). Le protocole utilisé est celui fourni par le détaillant. Succinctement, le volume de l'échantillon d'ADN a été complété à 45 µl avec de l'eau. L'ADN a été dénaturé à 95°C pendant 5 minutes, puis refroidi immédiatement sur glace pendant 5 minutes. L'ADN dénaturé a été transféré au tube réactionnel *Rediprime II* et 3 µl de [α -³²P] dCTP ont été ajoutés. Le tout a été mélangé puis incubé à 37°C pendant 30 minutes. La sonde a été purifiée en la centrifugeant sur une colonne « *illustra ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* » (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) selon le protocole du fournisseur. Finalement, l'activité de la sonde a été déterminée par décompte radioactif dans un compteur à scintillation.

II. Digestion ADN génomique

La technique a été effectuée essentiellement comme décrit dans le Sambrook (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Brièvement, 10 µg d'ADN génomique de chaque souris pré-identifiées ont été digérés par l'enzyme de restriction XhoI (Roche, Laval,

Canada). Pour ce faire, l'ADN a tout d'abord été mélangé au tampon correspondant et au volume d'eau approprié et les mélanges ont été incubés 2 heures à 4°C. 15 U d'enzyme ont été ajoutées et les échantillons ont été mélangés à 4°C pendant 2 minutes. Les échantillons ont ensuite été incubés à 37°C pendant 25 minutes, puis encore 15 U d'enzyme ont été rajoutées aux mélanges. La digestion a été poursuivie pour 8 heures à 37°C. Ensuite, l'ADN a été précipité à l'acétate de sodium 3M pH 5,2 et éthanol 100 %, et resuspendu dans 10 µl d'eau.

III. Séparation ADN sur gel d'agarose

Un gel d'agarose 0,7 % dans du tampon TAE 1X, sans bromure d'éthidium, a été utilisé pour séparer les ADNs génomiques digérés. Les échantillons d'ADNs ont d'abord été dénaturés à 70°C pendant 5 minutes, puis placés immédiatement sur glace. 1 µl de tampon de chargement (Bleu de bromophénol 0,25 %, Xylène cyanol 0,25 % et 30 % glycérol) a été ajouté aux échantillons et le gel a été migré à bas voltage : 1 heure à 40 volts, 1 heure à 80 volts et 3 h 30 min à 100 volts. Comme contrôle positif la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GAGTA4 digérée XhoI a été migrée à deux dilutions différentes (1/20 et 1/10).

IV. Dénaturation *in situ* de l'ADN migré

Le gel a été agité doucement dans une solution 0,2 M HCl à TP pendant 10 minutes (dépurination). Il a ensuite été rincé 1 fois avec de l'eau. Puis le gel a été agité doucement dans une solution 0,4M NaOH, pendant 15 minutes à TP à trois reprises (neutralisation)

V. Transfert de l'ADN du gel à la membrane de nylon

L'ADN a été transféré du gel à une membrane de transfert en nylon *Nytran N* (Whatman Schleicher & Schuell, PROTEIGENE, France), dans le tampon de transfert SSC 20X (3,0 M NaCl, 0,3 M sodium citrate). Le transfert a été effectué par capillarité O/N en utilisant un montage en sandwich tel que décrit dans le Sambrook (SAMBROOK et RUSSELL, 2001).

VI. Fixation de l'ADN sur la membrane

Le montage de transfert a été défait en prenant soin de marquer au crayon de plomb sur la membrane l'emplacement des puits du gel. La membrane a été asséchée brièvement sur du papier absorbant et l'ADN a été fixé sur la membrane en soumettant cette dernière à des rayons UV pendant 2 minutes.

VII. Pré-hybridation de la membrane

La solution d'hybridation « *ULTRAhyb Ultrasensitive Hybridization Buffer* » (Ambion, Streetsville, Canada) a été préchauffée à 68°C pour dissoudre les précipités. La membrane a été hydratée au besoin pendant 1-2 minutes dans de l'eau et elle a été préhybridée dans 10 ml de solution d'hybridation pendant 30 minutes à 42°C.

VIII. Hybridation de la membrane avec la sonde

La sonde a été dénaturée à 95°C pendant 5 minutes, puis placée immédiatement sur glace pendant 5 autres minutes. 10^6 cpm/ml de sonde ont été ajoutés au sac contenant la membrane et la solution d'hybridation, et le tout a été incubé O/N à 42°C.

IX. Lavage de la membrane et exposition K-screen

La membrane hybridée a été lavée dans une solution SSC 2X, 0,1 % SDS, à 42°C pendant 5 minutes à deux reprises. Puis elle a été lavée dans une solution SSC 0,1X, 0,1 % SDS à 42°C pendant 15 minutes à deux reprises. La membrane a été placée dans une cassette d'exposition (*Kodak screen*) (Biorad, Mississauga, Canada) durant trois jours. L'écran a ensuite été révélé en utilisant l'appareil *Molecular Imager FX* (Biorad, Mississauga, Canada).

Résultats

Les résultats présentés dans ce mémoire découlent entièrement de mon travail effectué majoritairement au cours de ma maîtrise et pendant mes deux stages réalisés en 2004 et 2005 dans le laboratoire du professeur François Boudreau.

1. Interférence à l'ARN pour GATA4

Le facteur de transcription GATA4 régule l'expression de gènes tissus spécifiques. Il existe plusieurs membres de la famille des facteurs GATA, présentant chacun des patrons spécifiques d'expression. À cet effet, au niveau de l'épithélium intestinal, GATA4 est le membre majeur et est retrouvé principalement exprimé dans les cellules différenciées des villosités. À ce niveau, GATA4 régule la transcription de gènes utilisés comme marqueurs de la différenciation. L'objectif principal de ce projet de recherche consiste à approfondir le rôle de GATA4 au sein de l'épithélium intestinal, par l'identification de nouveaux gènes cibles de ce facteur de transcription. Le modèle de différenciation de cellules épithéliales intestinales provenant d'iléon de rat IEC-6/Cdx2 a été utilisé pour ce projet. Ce modèle cellulaire est dérivé des cellules indifférenciées et cryptales IEC-6 et contrairement à ces dernières, les cellules IEC-6/Cdx2 montrent une forte expression de GATA4, facteur GATA majoritaire de ces cellules (BOUDREAU, données non publiées).

Pour nous permettre l'identification de nouveaux gènes cibles de GATA4, une approche par interférence à l'ARN fut utilisée pour réduire l'expression de GATA4

dans les cellules épithéliales intestinales IEC-6/Cdx2. Puis, une étude différentielle par criblage de micropuces à ADN a été effectuée dans des cultures shGATA4 à court terme pour identifier des cibles potentiellement directes de GATA-4.

Des tests de validité de réduction de l'expression de GATA4, à l'aide des trois shRNA clonés (#1, 2 et 3), ont été réalisés dans les cellules IEC-6/Cdx2. Les résultats d'immunobuvardage ont montré une réduction variable des niveaux protéiques de GATA4 selon le shRNA utilisé. La meilleure diminution étant d'environ 50 à 75 % obtenue avec le shGATA4 #3 (Fig. 10).

Les outils shGATA4 #1 et #3, les deux plus efficace en culture à court terme pour la diminution de l'expression de GATA4, se sont également avérés efficace dans une culture à long terme, c'est-à-dire jusqu'à 20 jours de culture des cellules IEC-6/Cdx2 (Fig. 11a). Ces cultures ont également démontré une stabilité dans l'expression de Cdx2 et de PPAR γ , deux marqueurs de différenciation reconnus de l'épithélium intestinal (Fig. 11a). De plus, les mêmes outils shRNA se sont avérés être efficace également dans un modèle de co-culture, qui consiste à cultiver les cellules IEC-6/Cdx2 sur des cellules mésenchymateuses isolées d'intestin de fœtus humain (LUSSIER et al, 2007). Deux co-cultures indépendantes ont démontré le potentiel réduit d'expression de GATA4 sous l'action des constructions intégrées de shGATA4 #1 et #3 (Fig. 11b). L'expression de Cdx2, dans ces conditions de co-cultures, a montré une diminution d'expression en présence du shGATA4 #3, ce shRNA étant celui avec la plus forte efficacité (Fig. 11b).

**Figure 10. Diminution de l'expression de GATA4 dans les cellules IEC-6/Cdx2
shRNA(GATA4)**

Immunobuvardage de type western, avec un anticorps spécifique contre GATA4, permettant d'évaluer la diminution du niveau protéique de GATA4 dans les cellules IEC-6/Cdx2 grâce à l'outil shGATA4 #3. Les extraits protéiques utilisés proviennent d'extraction de protéines totales réalisées sur les cultures shGATA4 #3 et sur les cultures contrôles lenti vide et sans infection, 4 jours après l'infection. Toutes les conditions de cultures ont été induites à la différenciation par ajout d'IPTG au milieu de culture, 2 jours après l'infection. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

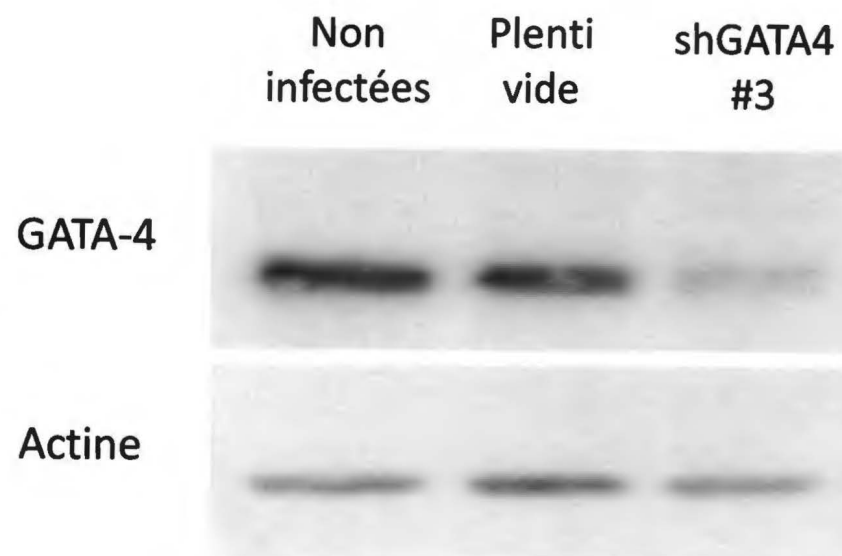


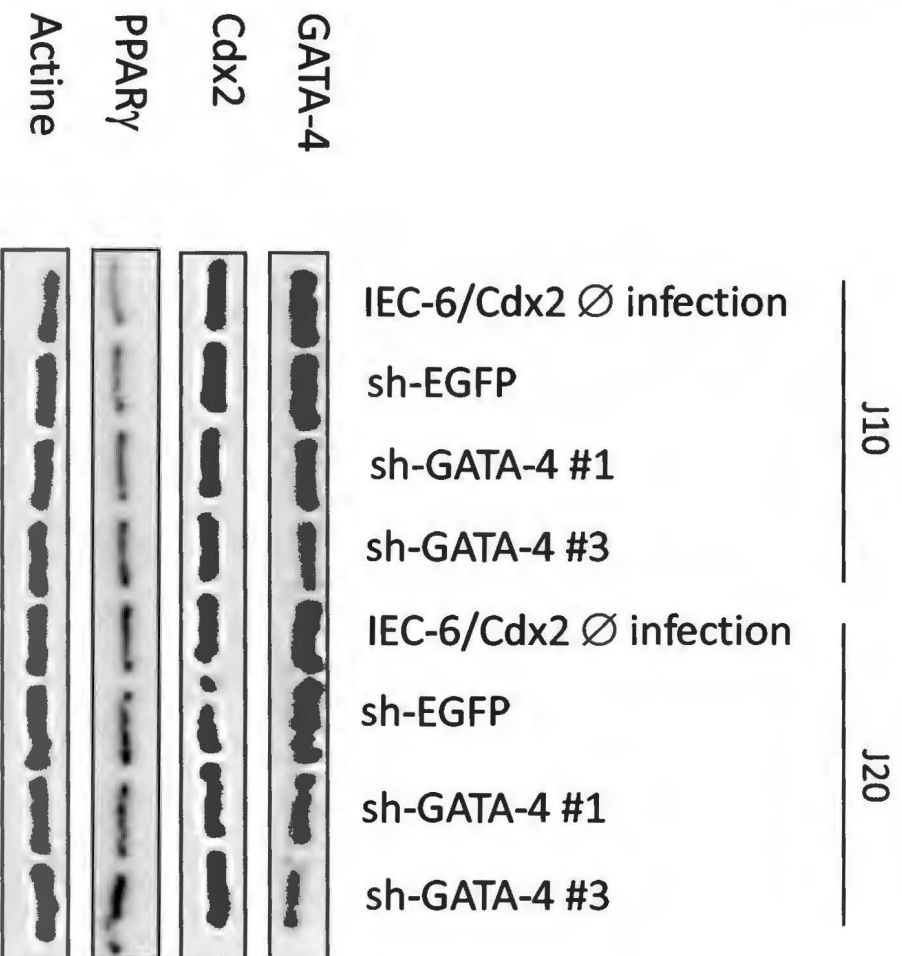
Figure 11. Expression de GATA4, Cdx2 et PPAR γ dans différentes conditions de cultures à long terme des cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4

A) Culture des cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4 effectuée sur plastique.

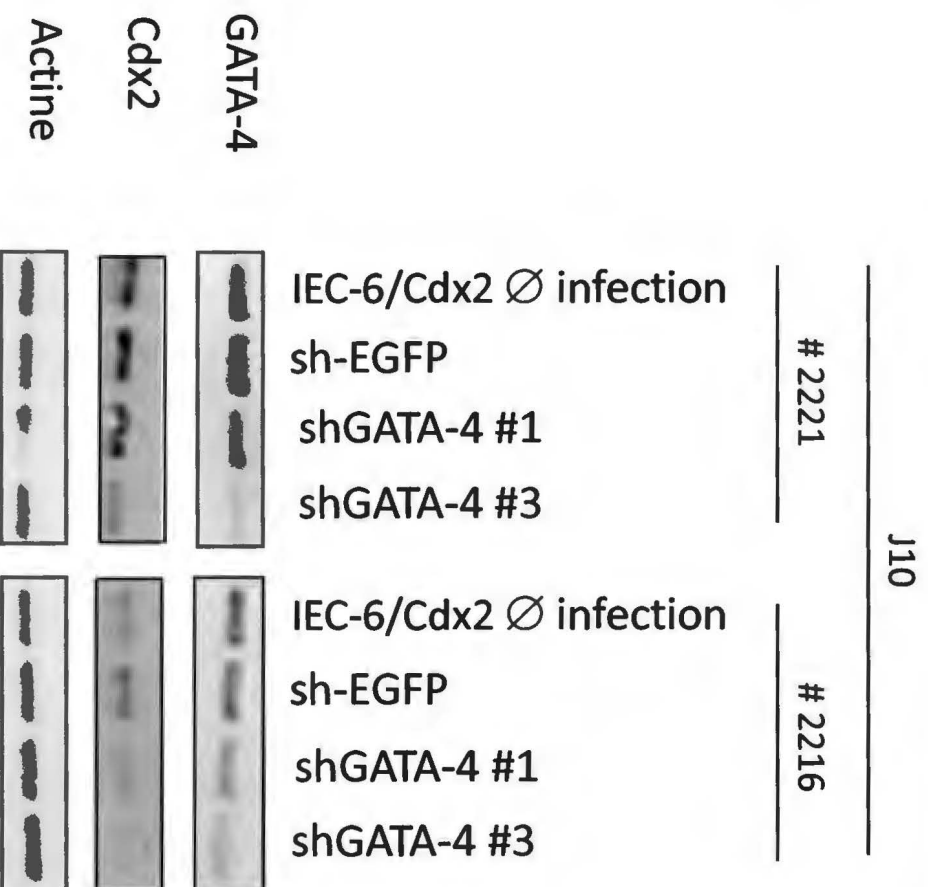
Immunobuvardage de type western, avec un anticorps spécifique dirigé contre GATA4, réalisé avec les extraits protéiques totaux de cellules IEC-6/Cdx2 non infectées ou infectées avec shEGFP, shGATA4 #1 ou shGATA4 #3. Toutes les cellules ont été induites à la différenciation, par l'ajout d'IPTG au milieu de culture 2 jours après les infections et les extraits ont été réalisés 10 ou 20 jours après ces mêmes infections. La même membrane a été utilisée pour l'immunobuvardage avec les anticorps contre GATA4, Cdx2 et PPAR γ . L'actine a également été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

B) Co-culture des cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4. Immunobuvardage de type western, avec un anticorps spécifique dirigé contre GATA4, réalisé avec les extraits protéiques totaux de co-cultures (cellules IEC-6/Cdx2 cultivées sur les lignées des cellules mésenchymateuses #2221 ou #2216) non infectées ou infectées avec shEGFP, shGATA4 #1 ou shGATA4 #3. Les extraits ont été réalisés 10 jours après les infections. La même membrane a été utilisée pour l'immunobuvardage avec les anticorps contre GATA4 et Cdx2. L'actine a également été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

A



B



2. Identification de nouvelles cibles potentielles de GATA4

Une cinétique à court terme a été réalisée, en triplicata, pour permettre l'identification de nouvelles cibles de GATA4 par analyse de micropuces d'ADN *Affymetrix*. Des cellules IEC-6/Cdx2 ont été infectées par le shGATA4 #3 ou par le vecteur lentiviral vide comme population contrôle. Deux jours après l'infection, les cellules ont été induites à la différenciation par ajout d'IPTG au milieu de culture. Enfin, deux jours après cette induction, des extraits d'ARN ont été effectués sur les deux populations de cellules. Afin de valider la baisse des niveaux d'ARNm de GATA4 dans les cultures shGATA4, une analyse par Q-PCR a été réalisée, montrant une diminution de ces niveaux de 57 % comparativement aux cultures contrôles (Fig. 12a). Les extraits d'ARN validés, et dont l'intégrité a aussi été vérifiée sur gel, ont alors été utilisés pour le criblage de micropuces contenant 30 000 séquences distinctes d'oligonucléotides du génome de rat. Cette analyse a permis d'identifier au total 13 cibles potentielles de GATA4 (Fig. 12b). Parmi ces cibles, quatre, dont les variations d'expression étaient plus importantes, ont été sélectionnées pour validation.

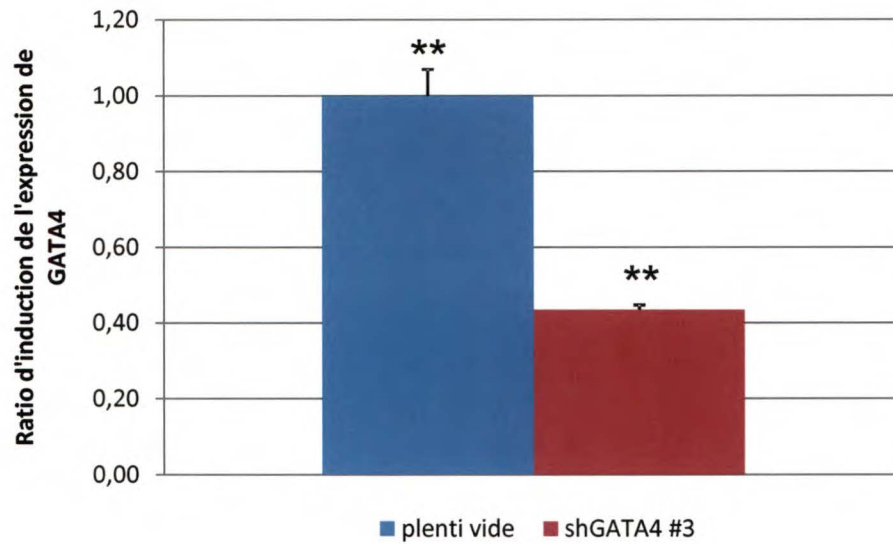
L'expression à court et long terme, des gènes PAPI, PAPIII, NCAM1 et GPX2, a été déterminée par RT-PCR dans les cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4 #1 et #3 ainsi que dans les cellules contrôles IEC-6/Cdx2 de base et IEC-6/Cdx2 infectées avec le vecteur lentiviral vide. Les transcrits des gènes PAPI et PAPIII ont montrés une induction maintenue de l'expression au cours de la différenciation des cellules IEC-6/Cdx2 de base, de jour 5 à jour 20. Tandis que dans les conditions shGATA4 (#1 et #3), l'expression de ces transcrits diminue fortement jusqu'à l'abolition presque totale dans le cas de PAPI à jour 20 (Fig. 13). Pour ce qui est de l'expression des

Figure 12. Analyse *Affymetrix* comparative entre les conditions de culture plenti vide et shGATA4 #3 dans les cellules IEC-6/Cdx2

A) Validation des ARNs utilisés. PCR quantitatif (Q-PCR) permettant d'évaluer la diminution d'ARNm GATA4 dans les extraits cellulaires utilisés pour l'analyse *Affymetrix*. Les extraits d'ARN proviennent de cultures de cellules IEC-6/Cdx2 infectées par l'outil shGATA4 #3 ou le vecteur lentiviral vide et réalisées en triplicata. L'extraction d'ARN a été effectuée 4 jours suivant l'infection et les cellules ont été induites à la différenciation par ajout d'IPTG au milieu de culture 2 jours après l'infection. Les résultats obtenus en triplicata sont rapportés en termes de ratio d'induction d'expression (moy \pm SEM) par rapport au contrôle d'infection plenti vide ($P < 0,05$). Les niveaux d'expression du gène HPRT ont été utilisés comme références pour ajuster les quantités d'ARN utilisées dans chaque échantillon.

B) Résultats de l'analyse *Affymetrix*. Ce tableau répertorie le nom des cibles potentielles de GATA4 suite à l'analyse différentielle d'une micropuce à ADN contenant 30 000 séquences distinctes d'oligonucléotides du génome de rat. L'analyse a été effectuée en triplicata avec une population de cellules IEC-6/Cdx2 infectées par l'outil shGATA4 #3 comparativement à une population contrôle de cellules IEC-6/Cdx2 infectées par le vecteur lentiviral vide. L'analyse a été effectuée avec les paramètres suivants : modulation de plus de 2 fois avec une probabilité de 0.05. Selon ces critères, neuf cibles ont été identifiées avec une variation à la baisse, dont GATA4, et cinq cibles avec une variation à la hausse.

A

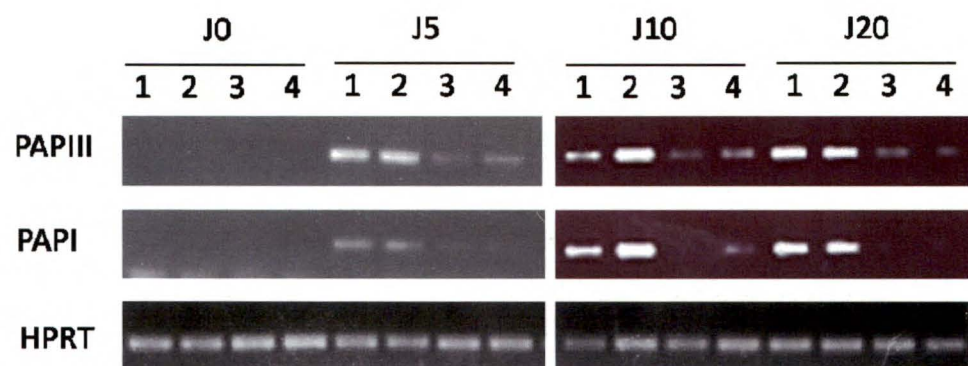


B

Nom gène	Modulation statistique (fold≥1.5; p≤0.05)
	shGATA-4
Pancreatitis-associated protein I (PAPI)	-1,8
Pancreatitis-associated protein III (PAPIII)	-1,8
Glutathione peroxylase 2 (GPX2)	-1,6
JNK inhibitory kinase (JIK)	-1,5
Guanine nucleotide binding protein 12 (Gng12)	-1,8
FH1/FH2 domains-containing protein Formin homologue	-1,6
RAB3A interacting protein (Rabin 3)	-1,7
Predicted similar to LIM cell antigen-like domains 1	-1,5
GATA-4	-2,1
Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1)	1,7
Low density lipoprotein related protein 6	1,7
Predicted F-box protein 28	1,5
Similar to RIKEN cDNA 2010005013	1,6
Unknown (accession number AW522926)	1,6
Total : 13 cibles identifiées (sur une possibilité de + 30 000 séquences distinctes d'oligonucléotides)	

Figure 13. Validation des cibles PAPIII et PAPI dans une cinétique de culture de cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4 à long terme

RT-PCR semi-quantitatif, réalisé avec les extraits d'ARN de cellules IEC-6/Cdx2 non infectées ou infectées avec le vecteur lentiviral sans portion sh (plenti vide) ou avec les vecteurs shGATA4 #1 et shGATA4 #3. Toutes les cellules ont été induites à la différenciation, par ajout d'IPTG au milieu de culture 2 jours après les infections et les extraits ont été réalisés 0, 5, 10 ou 20 jours après les infections. L'amplification a été réalisée en parallèle avec des amorces pour l'analyse de l'expression de PAPIII et PAPI. L'expression du gène HPRT a également été analysée afin de s'assurer de la constance des quantités d'ARN utilisées. Les résultats sont représentatifs d'une cinétique effectuée en simplicata.



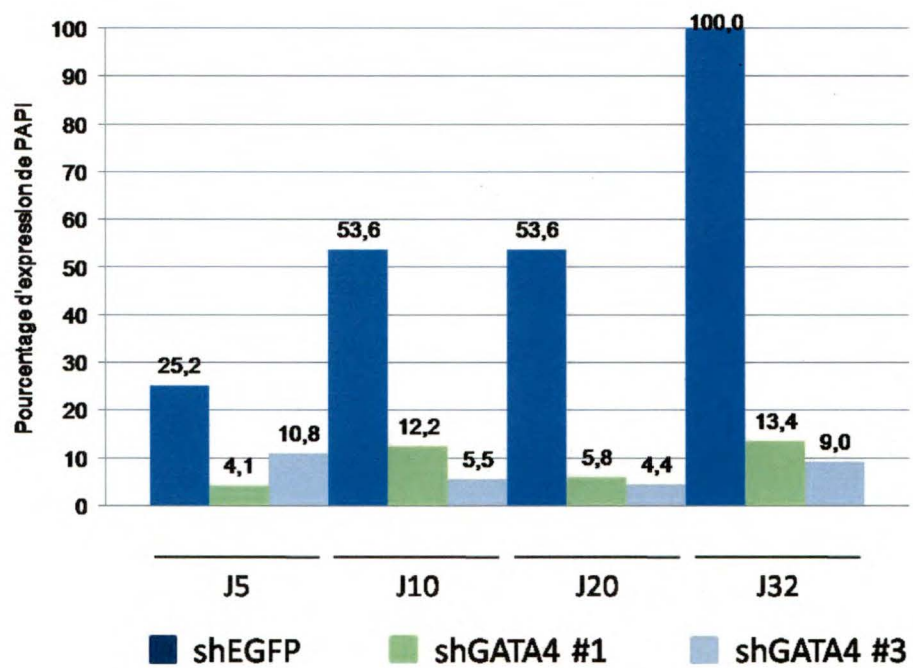
1=IEC-6/Cdx2; 2=plenti vide; 3=shGATA4 #1; 4=shGATA4 #3.

Figure 14. Analyse quantitative de l'expression du gène PAPI dans des cinétiques de culture de cellules IEC-6/Cdx2 à long terme

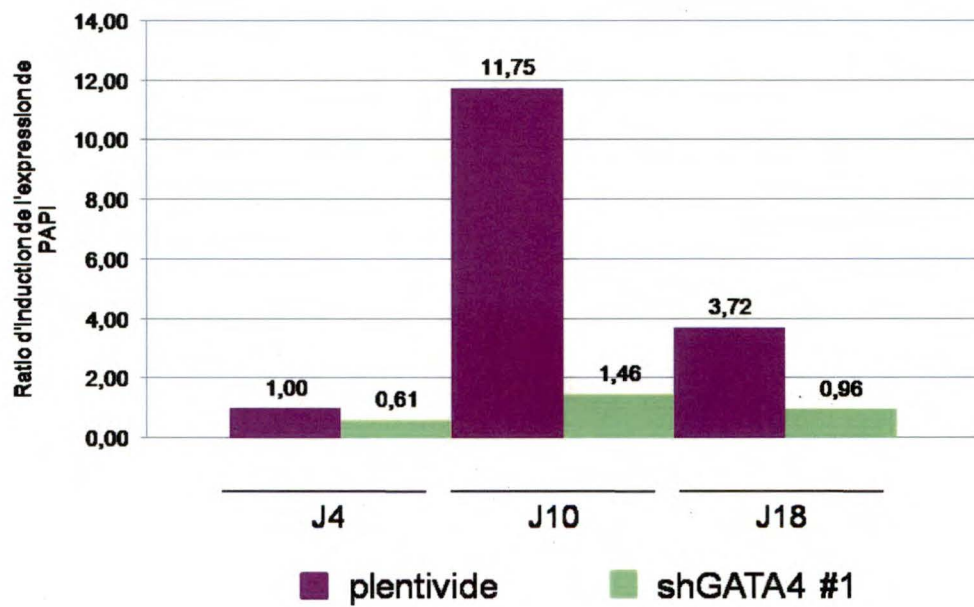
A) Détection par PCR quantitatif (Q-PCR) de l'ARNm de PAPI dans des extraits d'ARN de cellules IEC-6/Cdx2 infectées avec shEGFP ou avec shGATA4 #1 ou #3. Les cellules ont été induites à la différenciation, par ajout d'IPTG au milieu de culture 2 jours après les infections et les extraits ont été réalisés 5, 10, 20 et 32 jours après les infections. Les résultats obtenus sont rapportés en termes de pourcentage d'expression par rapport à la condition shEGFP J32 établie à 100 %, car les niveaux d'expression à jour 0 étaient tous indétectables. Les niveaux d'expression du gène TBP ont été utilisés comme références pour ajuster les quantités d'ARN utilisées dans chaque échantillon. Les résultats sont représentatifs d'une cinétique effectuée en simplicata.

B) Détection par PCR quantitatif (Q-PCR) de l'ARNm de PAPI dans des extraits d'ARN de cellules IEC-6/Cdx2 infectées avec le vecteur lentiviral sans portion sh (plenti vide) ou avec shGATA4 #1. Les cellules ont été induites à la différenciation, par ajout d'IPTG au milieu de culture 2 jours après les infections et les extraits ont été réalisés 4, 10 et 18 jours après les infections. Les résultats obtenus sont rapportés en termes d'induction d'expression par rapport au contrôle plenti vide J4. Les niveaux d'expression du gène TBP ont été utilisés comme références pour ajuster les quantités d'ARN utilisées dans chaque échantillon. Les résultats sont représentatifs d'une cinétique effectuée en simplicata.

A



B



transcrits des gènes NCAM1 et GPX2, aucune corrélation avec l'expression de GATA4 n'a été observée (résultats non montrés).

Pour obtenir une analyse quantitative de l'expression du gène validé PAPI, une étude par Q-PCR a été réalisée. Cette étude a montré, que pour deux cinétiques à long terme de cultures de cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4 indépendantes, l'expression de PAPI est diminuée radicalement en comparaison avec les cultures contrôles (Fig. 14).

3. Dépendance de l'expression du gène PAPI en fonction de GATA4

Pour étudier la réversibilité de l'expression du gène PAPI en fonction de la présence du facteur de transcription GATA4, une expérience nommée « *récupération* GATA4 » a été réalisée. Cette expérience a pour but de rétablir l'expression de GATA4 dans les cellules IEC-6/Cdx2 ayant subi une baisse de l'expression de cette protéine grâce à l'outil d'interférence à l'ARN.

Pour ce faire, une construction d'expression d'un ADNc GATA4 muté, nommée mutG4, a été réalisée dans le vecteur rétroviral pBabepuro (Fig. 15a). L'ARNm, résultant de l'expression de la construction mutG4, comporte 6 mutations ponctuelles, au sein de la région reconnue spécifiquement par le shGATA4 #3. Ces mutations empêchent la reconnaissance base à base du sh sur cet ARNm, bloquant donc la dégradation de ce dernier et la régulation négative de l'expression de la protéine d'intérêt. À cet effet, la protéine GATA4 formée contient la même séquence d'acides aminés que la protéine native, donc aucune différence de structure n'existe entre ces deux protéines. Un immunobuvardage de type western a été réalisé sur des extraits de protéines totales de cellules 293T transfectées avec la construction mutG4 ou le

Figure 15. Réversibilité de l'expression de GATA4

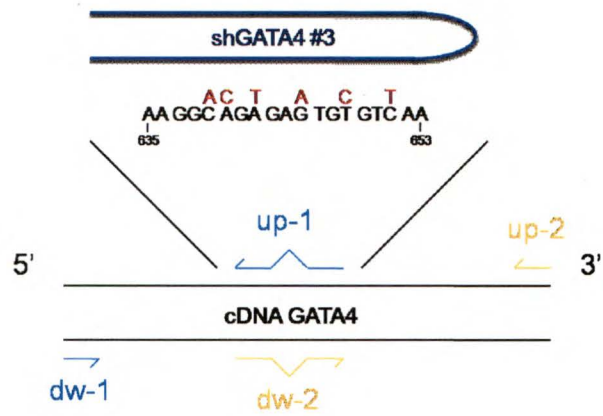
A) Mutagenèse dirigée par PCR. Schéma de la position des oligonucléotides utilisés pour effectuer la mutagenèse par PCR dans le but d'inclure 6 mutations ponctuelles au sein du cDNA de GATA4, dans la région ciblée par le shGATA #3.

B) Validité de l'outil « récupération GATA4 ». Immunobuvardage de type western effectué avec un anticorps spécifique dirigé contre GATA4 pour valider la production d'une protéine GATA4 par la construction pBabepuro/mutG4. Les extraits utilisés proviennent d'extractions de protéines totales réalisées sur des cellules 293T, 2 jours après leur transfection avec la construction rétrovirale pBabepuro/mutG4, le vecteur contrôle pBabepuro ou un vecteur de surexpression de GATA4 (contrôle positif de l'expression de GATA4, Ctr+). Comme contrôle négatif des extraits de protéines totales de cellules 293T non-transfectées ont été utilisées. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées. Les résultats sont représentatifs d'une cinétique.

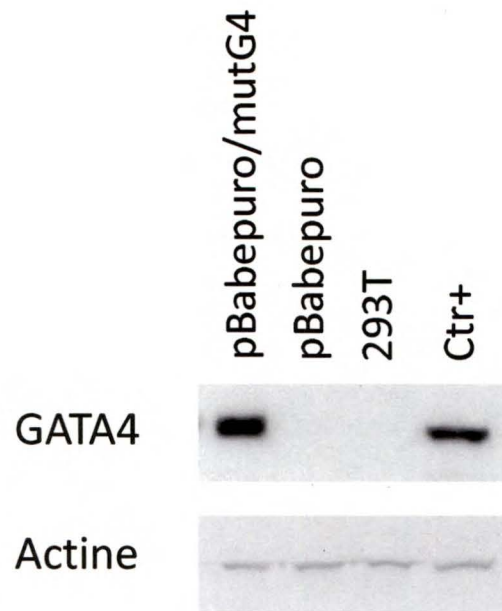
C) Expérience « récupération GATA4 » dans les cellules IEC-6/Cdx2.

Immunobuvardage de type western effectué sur les extraits de protéines totales de l'expérience de « récupération GATA4 », avec un anticorps spécifique dirigé contre GATA4. Neuf différentes conditions de culture ont été utilisées (voir texte). Des protéines extraites de cellules 293T transfectées avec un vecteur de surexpression de GATA4 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression de GATA4 (Ctr⁺). L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées. Les résultats sont représentatifs d'une cinétique.

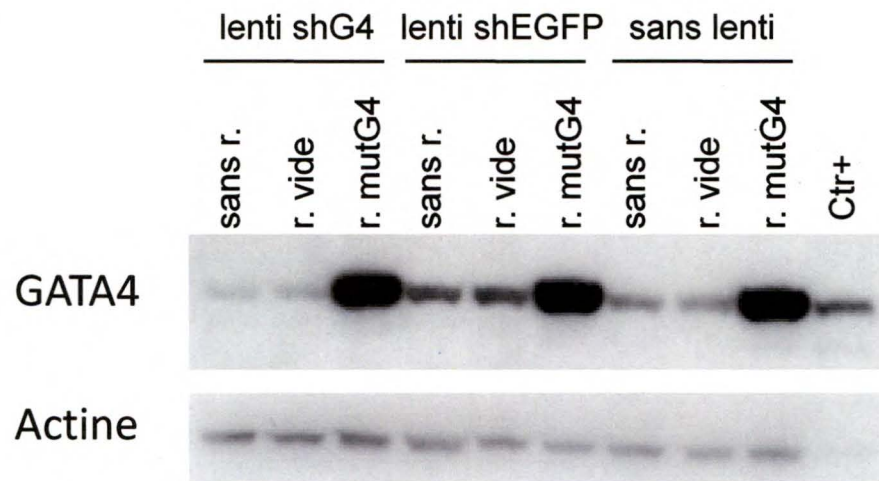
A



B



C



sans r.: sans rétro; r. vide: rétro vide; mutG4: rétro/mutG4

vecteur rétroviral pBabepuro vide et de cellules 293T non-transfectées. Cette expérience a montré l'expression d'une protéine de la même taille que GATA4, dans la condition de transfection mutG4 (Fig. 15b).

Cette construction a ensuite été utilisée pour réaliser l'expérience «*récupération GATA4*». L'expérience prévoit deux infections consécutives des cellules IEC-6/Cdx2 ; une première par le lentivirus shGATA4 #3, pour induire la réduction d'expression de GATA4 et une deuxième par le rétrovirus mutG4, pour rétablir l'expression du facteur. Nous avons utilisé un vecteur rétroviral pour le clonage de l'ADNc mutG4, pour limiter la possibilité de résistance des cellules à une deuxième infection par le même type de virus. Nous avons planifié l'expérience en tenant compte que les rétrovirus, au contraire des lentivirus, ne peuvent infecter que les cellules en prolifération, donc des cellules qui n'ont pas encore atteint la confluence. Les cellules IEC-6/Cdx2, à environ 10 % de confluence, ont donc été infectées par les virus lentiviraux shGATA4 #3 et shEGFP comme contrôle. Aussi une partie des cellules n'a pas subi d'infection lentivirale. Une heure après l'infection lentivirale, toutes les cellules ont été induites à la différenciation par ajout d'IPTG au milieu de culture. Deux jours plus tard, les trois populations de cellules IEC-6/Cdx2 (shG4, shEGFP et sans lenti), à environ 25 % de confluence, ont été utilisées pour les infections rétrovirales suivantes : pBabepuro/mutG4 et pBabepuro (rétro vide) comme contrôle. Aussi, une partie des trois populations d'infection lentivirale n'a pas subi d'infection rétrovirale. Ainsi, à la fin du processus d'infection nous avons donc neuf conditions de culture différentes : trois conditions shGATA4, dont une sans rétro, une avec rétro vide et une avec rétro/mutG4 ; trois conditions shEGFP, dont une sans

rétro, une avec rétro vide et une avec rétro/mutG4 ; et trois conditions sans lenti, dont une sans rétro, une avec rétro vide et une avec rétro/mutG4. Des extraits de protéines totales ont été effectués 12 jours après les infections rétrovirales et une expérience d'immunobuvardage de type western a été réalisée avec ces extraits. Une forte compensation de l'expression de GATA4 a été observée dans la condition shGATA4 #3 + mutG4 (Fig. 15c). Cependant, dans ce contexte expérimental, l'expression en ARNm de PAPI, analysée par Q-PCR, a montré des niveaux élevés et constants sans lien avec l'expression de GATA4 (résultats non montrés).

4. Analyse du promoteur PAPI de rat

L'effet inhibiteur de shGATA4 sur l'expression génique de PAPI, nous suggère l'existence d'une régulation transcriptionnelle de GATA4 sur le promoteur de ce gène. Nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation du promoteur du gène PAPI en relation avec GATA4. L'étude détaillée du promoteur de ce gène, chez le rat, fut effectuée sur une zone limitée aux 1260 pb en amont du site d'initiation de la transcription, afin d'explorer si cette région pouvait contenir des motifs de liaison pour le facteur de transcription GATA4. Par analyse informatique avec l'aide du logiciel MathInspector (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/.eldorado/main.pl>), huit sites GATA potentiels ont été identifiés sur le promoteur du gène PAPI de rat et ont été numérotés de I à VIII (Fig. 16a). Aussi, cette analyse nous a permis d'identifier des sites potentiels d'interaction pour HNF1, CDP, Cdx1 et Cdx2 (Fig. 16a). HNF1 α et Cdx2 sont des partenaires connus d'interaction avec GATA4 dans la transcription

de gènes intestinaux tels que les gènes de la sucrase-isomaltase (BOUDREAU et al, 2002) et de la lactase (van WERING et al, 2004).

Ensuite, les huit sites GATA prédits ont été analysés séparément par gel de rétention, pour déterminer le potentiel *in vitro* de GATA4 à lier ces éléments. Pour ce faire, des transfections d'un vecteur d'expression de GATA4 (pcDNA/GATA4) et d'un vecteur contrôle (pcDNA) ont d'abord été réalisées dans les cellules 293T. Des extraits d'enrichissement des protéiques nucléaires ont ensuite été préparés et validés par immunobuvardage de type western (Fig. 16b) pour démontrer la production de la protéine GATA4. Ces extraits ont par la suite été utilisés pour réaliser les tests d'interaction avec sept sondes GATA représentant les huit sites potentiels GATA de la région promotrice de PAPI à l'étude. Les tests d'interaction ont été réalisés soit sans extrait (condition 1) ou avec les extraits pcDNA comme contrôle (condition 2) ou avec les extraits pcDNA/GATA4 (condition 3). Les huit sites ont démontré un potentiel d'interaction avec GATA4, comme on peut le voir dans les conditions 3, dont cinq beaucoup plus fortement, soit les sites II, V, VI, VII et VIII (Fig. 17).

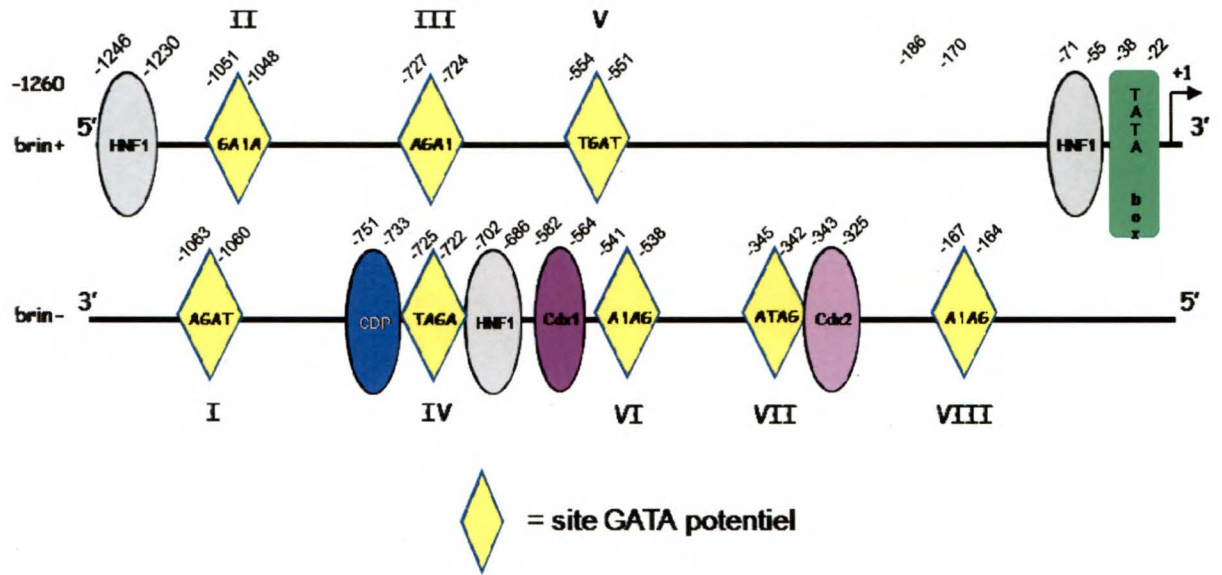
Figure 16. Analyse du promoteur du gène PAPI de rat

A) Schéma des sites d'interaction potentielle du promoteur du gène PAPI.

Analyse informatique par le logiciel MathInspector d'une portion de 1260 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène PAPI de rat. Cette portion promotrice contient huit sites potentiels d'interaction pour GATA, ainsi que quatre sites potentiels d'interaction pour HNF1, un pour CDP, un pour Cdx1 et un pour Cdx2.

B) Production de protéine GATA4 *in cellulo*. Immunobuvardage de type western, réalisé sur des extraits d'enrichissement de protéines nucléaires provenant de la transfection de cellules 293T par un vecteur d'expression de GATA4 (pcDNA/GATA4) ou un vecteur contrôle (pcDNA), avec un anticorps spécifique contre GATA4. Des protéines extraites de cellules 293T transfectées avec un vecteur de surexpression de GATA4 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression de GATA4 (Ctr⁺). L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

A



B

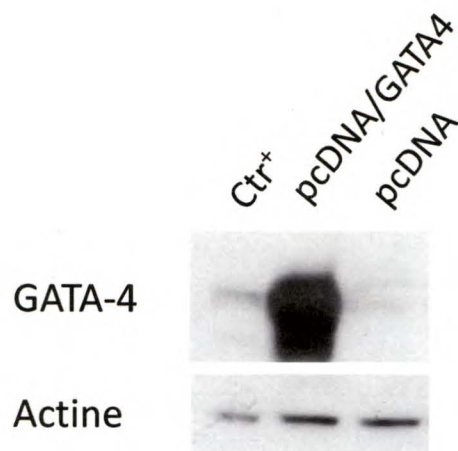
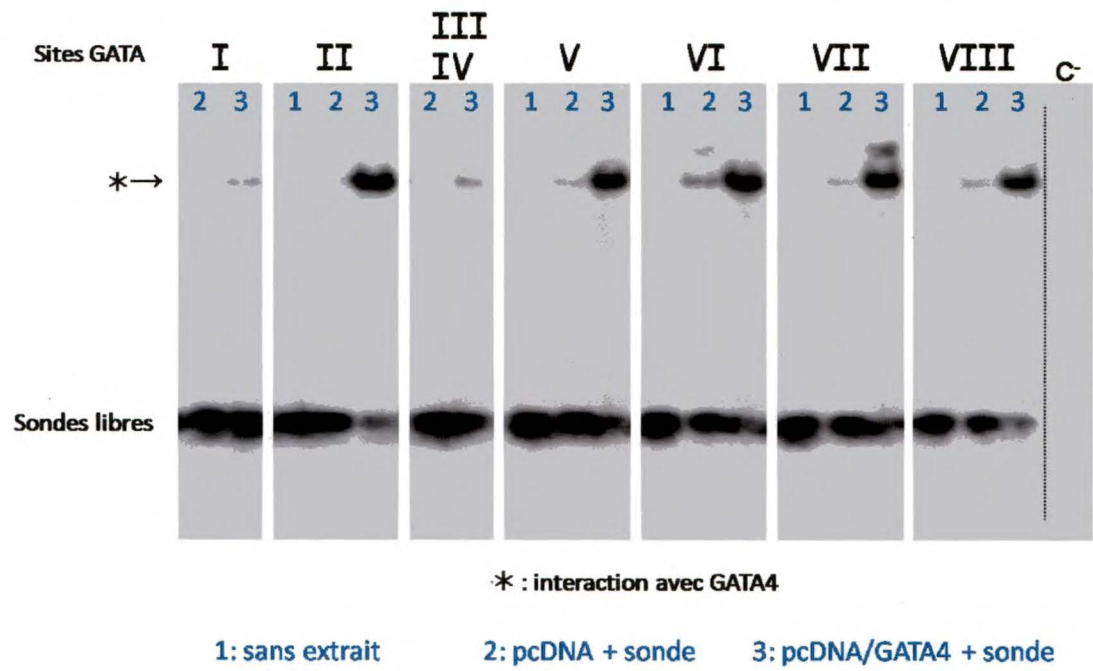


Figure 17. Analyse des huit sites potentiels GATA sur le promoteur du gène PAPI de rat par gel de rétention

Les extraits protéiques migrés à la figure 16b ont été utilisés pour réaliser les tests d'interaction avec sept sondes GATA différentes, représentant les huit sites potentiels d'interaction GATA sur le promoteur du gène PAPI. Pour la condition 1, les tests d'interaction ont été réalisés sans extrait protéique, dans la condition 2, ils ont été réalisés avec les extraits pcDNA, tandis que la condition 3 représente les tests d'interaction réalisés avec les extraits pcDNA/GATA4. Les bandes dans le bas du gel représentent les sondes libres non liées par les protéines d'intérêts. Comme contrôle négatif de migration (C⁻), le tampon de chargement (LB) a été migré seul. L'astérisque représente les complexes de rétention formés entre les sondes GATA et la protéine GATA4, retrouvés principalement dans les conditions 3. Les résultats sont représentatifs d'une expérience.



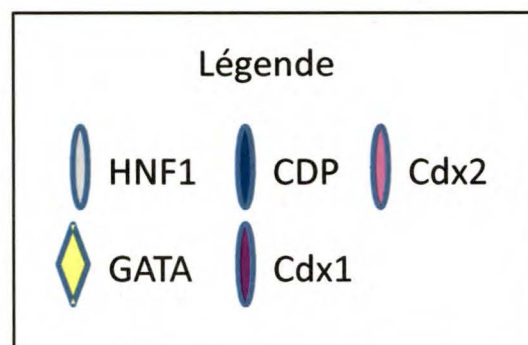
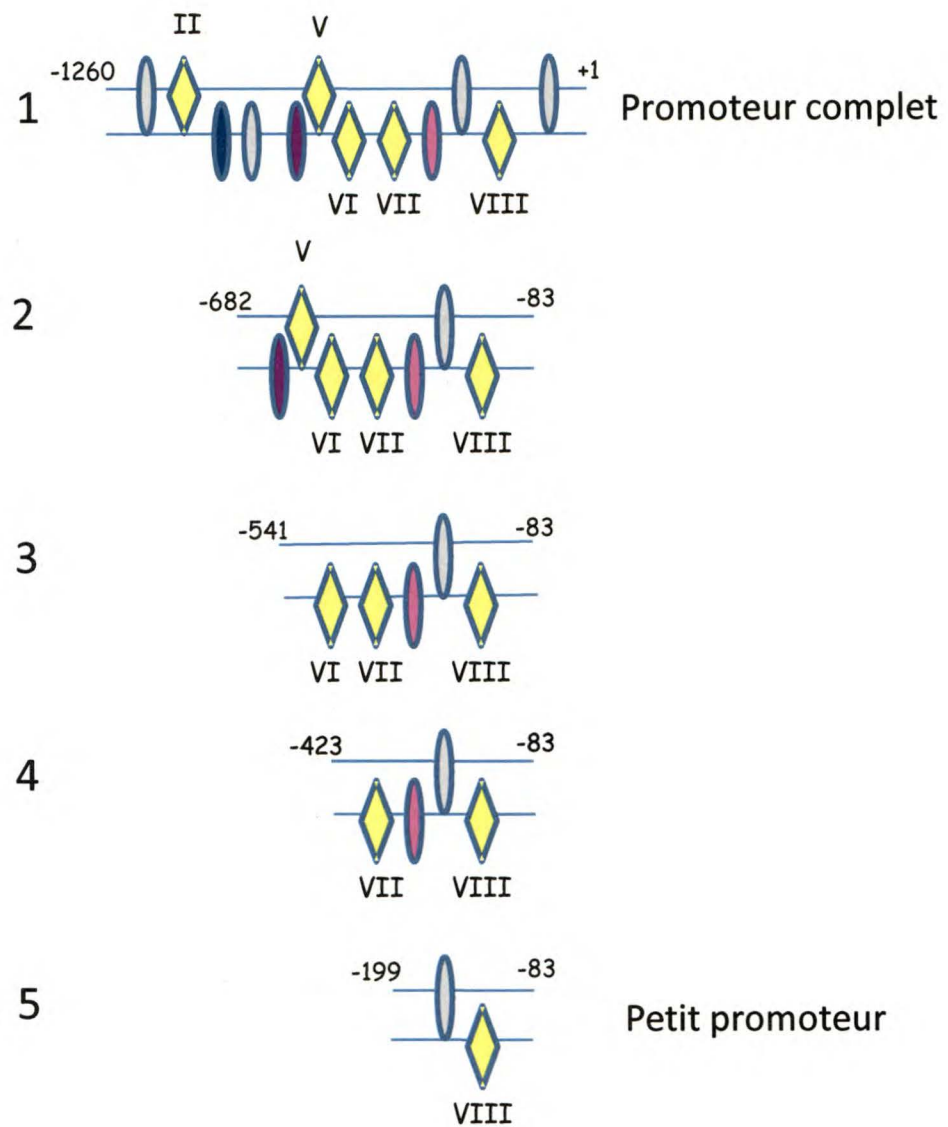
5. Analyse de l'activité transcriptionnelle de GATA4 sur le promoteur PAPI de rat

Pour vérifier le potentiel de GATA4 à réguler la transcription du gène PAPI, des essais transcriptionnels ont été réalisés en utilisant différentes portions du promoteur de ce gène, couplés au gène rapporteur de la luciférase. Le vecteur pGL3 basic fut utilisé et les différentes portions du promoteur de rat de PAPI y ont été clonées, dans le site de clonage multiple entre les sites enzymatiques MluI et XhoI. Cinq constructions ont été réalisées, chacune comportant une section de plus en plus petite du promoteur à l'étude. La construction 1 comprend le promoteur complet de 1260 pb, donc les cinq sites de forte liaison de GATA4 ; la construction 2 comprend les sites de liaison GATA V à VIII ; la construction 3 comprend les sites VI à VIII ; la construction 4 les sites VII et VIII ; puis la construction 5 est un petit promoteur comprenant seulement le site GATA VIII (Fig.18).

Pour réaliser les essais transcriptionnels prévus, nous voulions, idéalement, utiliser une lignée de cellules épithéliales intestinales, pour reproduire plus fidèlement le contexte cellulaire où se produit l'action de GATA4 sur le promoteur du gène PAPI. Nous ne pouvions utiliser les cellules IEC-6/Cdx2 car leur potentiel de transfection est beaucoup trop faible. Nous avons tenté des cotransfections dans les cellules IEC-6. Il s'est avéré, cependant, que nous n'avons pu obtenir d'activation transcriptionnelle dans ces cellules. Nous nous sommes alors tournés vers les cellules Caco-2/15, qui proviennent d'adénocarcinome humain et qui sont reconnues pour avoir une bonne efficacité de transfection.

Figure 18. Schéma des différentes constructions du promoteur du gène PAPI utilisées dans les essais transcriptionnels

À partir de la portion de 1260 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène PAPI, cinq constructions du promoteur PAPI de rat (prom.PAP#1 à 5), couplées au gène rapporteur de la luciférase, ont été créées dans le vecteur pGl3basic. La première, appelée « promoteur complet », contient les cinq sites d'interaction forte pour GATA4, soit les sites II, V, VI, VII et VIII. La deuxième construction contient quatre sites GATA (V à VIII), la troisième en contient trois (VI à VIII), la quatrième deux (VII-VIII) et la cinquième, dite petit promoteur, contient seulement un site GATA (VIII).



Les essais transcriptionnels suivants ont été réalisés dans les cellules Caco-2/15 confluentes. L'utilisation de la construction 1 (sites II, V-VIII), soit le promoteur complet (Fig. 19a), a tout d'abord permis de déterminer le potentiel d'activation transcriptionnelle du facteur de transcription GATA4 sur le promoteur PAPI de rat, et ce, de façon quantité dépendante (Fig. 19b). L'utilisation d'une quantité de GATA4 de 400 ng a montré une stimulation maximale de l'activité transcriptionnelle, soit de 1.82 fois supérieure à l'activité obtenue sans la présence de GATA4. Ensuite, nous avons analysé si le potentiel d'activation transcriptionnelle du promoteur PAPI pouvait dépasser ce facteur de 1.82 fois, en combinant la présence de GATA4 avec un de ces partenaires d'interaction reconnus, soit Cdx2. Des essais transcriptionnels ont donc été réalisés dans cette optique, en utilisant la construction 1, soit le promoteur complet dans quatre différentes conditions, soit 1) sans facteur, 2) avec GATA4, 3) avec Cdx2 et 4) avec GATA4 et Cdx2. Les résultats nous montrent une hausse plus marquée de l'activation transcriptionnelle en présence d'une surexpression Cdx2 (3.21 fois) qu'en présence de GATA4 (1.82 fois). Nous observons un effet synergique en présence d'une surexpression combinée de GATA4 et Cdx2 (Fig. 19c).

Nous avons également effectué des essais transcriptionnels, dans les mêmes conditions, en utilisant les constructions 2, 3 et 4. Les résultats obtenus pour la construction 2 montrent une activation transcriptionnelle semblable en présence de GATA4 ou d'une surexpression de Cdx2, et suggère un effet additif lors de la présence combinée de GATA4 et Cdx2 (Fig. 20a). Les essais réalisés avec la construction 3, quant à eux, ne montrent pas d'activation transcriptionnelle appréciable pour aucune des conditions (Fig. 20b). Les résultats obtenus lors de

L'utilisation de la construction 4, montrent un retour de l'activation transcriptionnelle, avec un effet plus fort pour la surexpression de Cdx2 que pour GATA4, et suggère un effet additif lors de la présence combinée de ces facteurs de transcription (Fig. 20c).

Finalement, nous avons utilisé le petit promoteur (Fig. 21) pour analyser le potentiel transcriptionnel combiné de Cdx2 et de GATA4 sur le promoteur PAPI. Cette construction ne comporte qu'un site de liaison pour GATA4 et aucun site potentiel de liaison pour Cdx2. Les résultats nous ont montré un effet synergique pour l'activation transcriptionnelle de cette portion de promoteur du gène PAPI en présence combinée de GATA4 et Cdx2.

Des immunobuvardages de type western ont été réalisés sur les extraits combinés des triplicatas pour chacun des essais transcriptionnels effectués (Fig. 19, 20 et 21). Ils ont permis de valider les inductions d'expression des facteurs de transcription à l'étude, soit GATA4 et Cdx2. À ce sujet, nous avons remarqué une baisse systématique de l'expression de GATA4 lors de son expression combinée avec une surexpression du facteur Cdx2.

Figure 19. GATA4 et Cdx2 activent la transcription du promoteur PAPI

A) Schéma de la construction PAP#1. Le promoteur PAP#1 est couplé au gène rapporteur de la luciférase et clonée dans le vecteur pGL3basic.

B) Essais transcriptionnels en présence d'une quantité croissante de GATA4. Des cellules Caco-2/15 confluentes ont été cotransfectées en utilisant la Lipofectamine 2000 avec la construction PAP#1 ou le vecteur vide pGL3basic, en plus de SV40-*Renilla*, et différentes quantités d'un vecteur d'expression pour GATA4 (G4 : 0 à 400 ng). Les résultats représentent une seule expérience effectuée en triplicata.

C) Essais transcriptionnels en présence de GATA4 et Cdx2. Utilisation des conditions expérimentales expliquées en B avec cette fois différentes combinaisons des vecteurs d'expression pour GATA4 (G4 : 200 ng) et Cdx2 (50 ng). Les résultats sont représentatifs de trois expériences effectuées en triplicata.

Pour B et C) Les résultats obtenus en triplicata sont rapportés en termes d'induction de l'activité (moy \pm SEM) par rapport à la condition de transfection sans facteur de transcription et sont rationalisés par rapport à l'activité de base obtenue avec les constructions pGL3basic sans promoteur ajouté. Les niveaux d'expression des facteurs de transcription GATA4 et Cdx2 ont été validés par immunobuvardage de type western, avec les anticorps spécifiques contre chacun des facteurs de transcription, sur une combinaison des triplicatas des extraits des différentes conditions. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

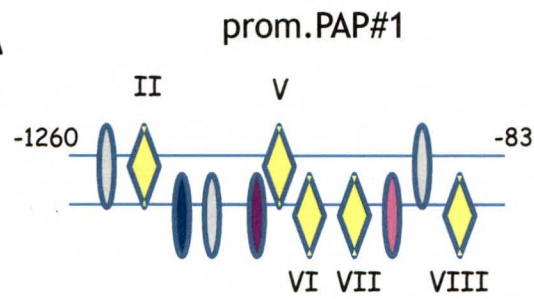
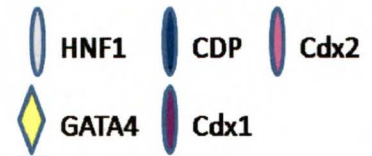
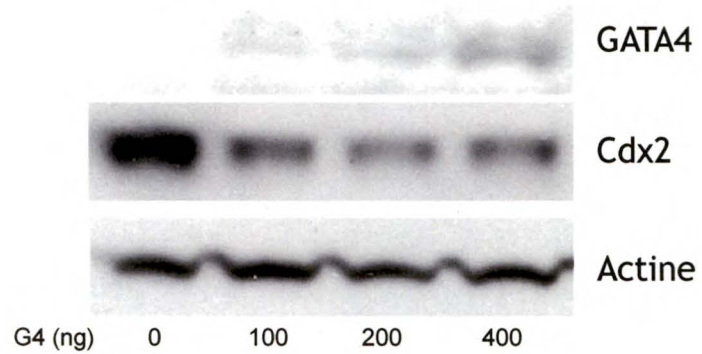
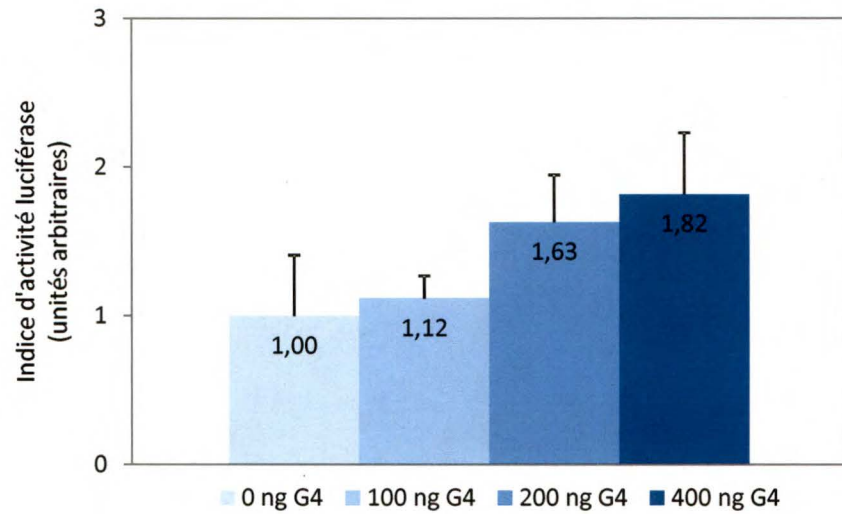
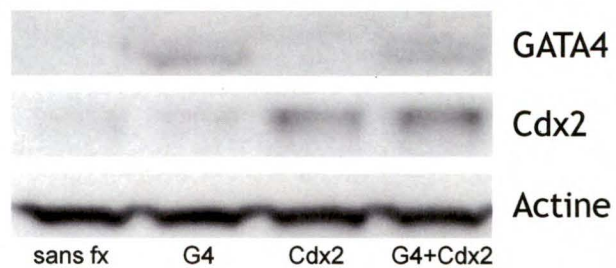
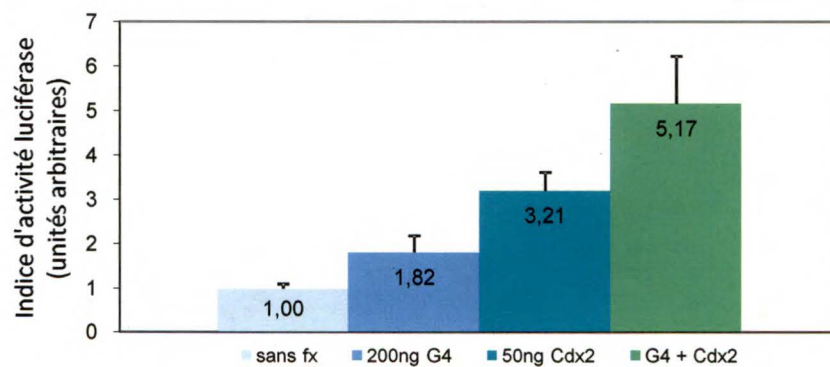
A**Légende****B****C**

Figure 20. GATA4 et Cdx2 régulent différemment la transcription du promoteur PAPI selon la région promotrice analysée

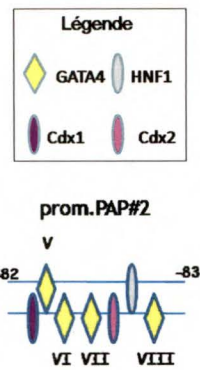
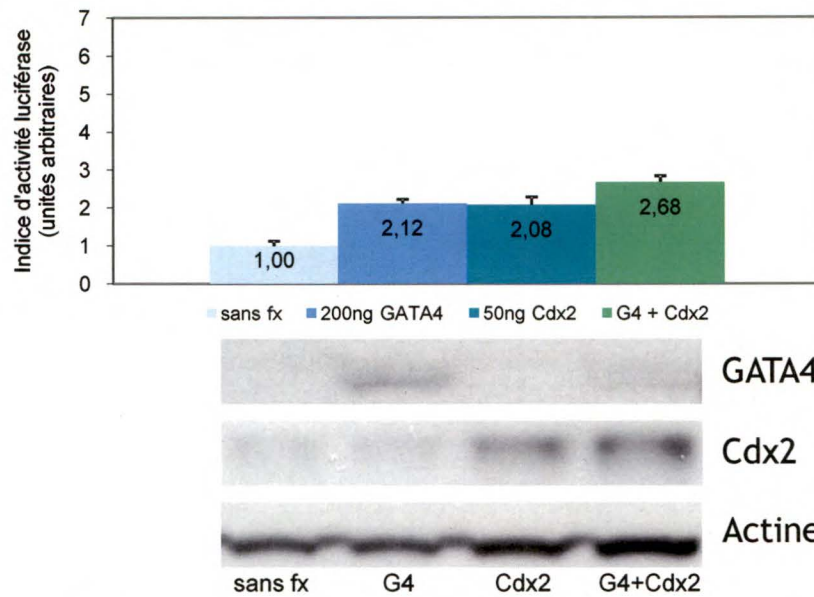
A) Construction PAP#2. Des cellules Caco-2/15 confluentes ont été cotransfectées en utilisant la Lipofectamine 2000 avec la construction PAP#2 ou le vecteur vide pGL3basic, en plus de SV40-*Renilla*, et différentes combinaisons des vecteurs d'expression pour GATA4 (G4 : 200 ng) et Cdx2 (50 ng). Les résultats sont rapportés en termes d'induction de l'activité (moy \pm SEM) par rapport à la condition de transfection sans facteur de transcription et sont rationalisés par rapport à l'activité de base obtenue avec les constructions pGL3basic sans promoteur ajouté. Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience effectuée en triplicata.

Les niveaux d'expression des facteurs de transcription GATA4 et Cdx2 ont été validés par immunobuvardage de type western, avec les anticorps spécifiques pour chacun des facteurs de transcription, sur une combinaison des triplicatas des extraits des différentes conditions. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

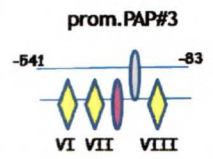
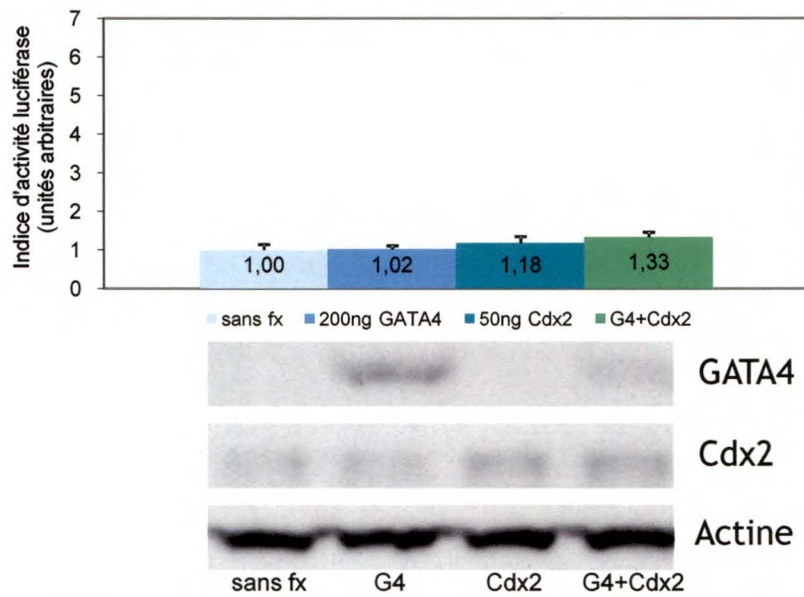
B) Construction PAP#3. Mêmes conditions expérimentales et d'analyse qu'en A avec la construction promotrice PAP#3. Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience effectuée en triplicata.

C) Construction PAP#4. Mêmes conditions expérimentales et d'analyse qu'en A avec la construction promotrice PAP#4. Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience effectuée en triplicata.

A



B



C

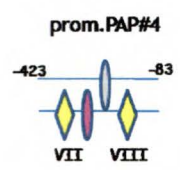
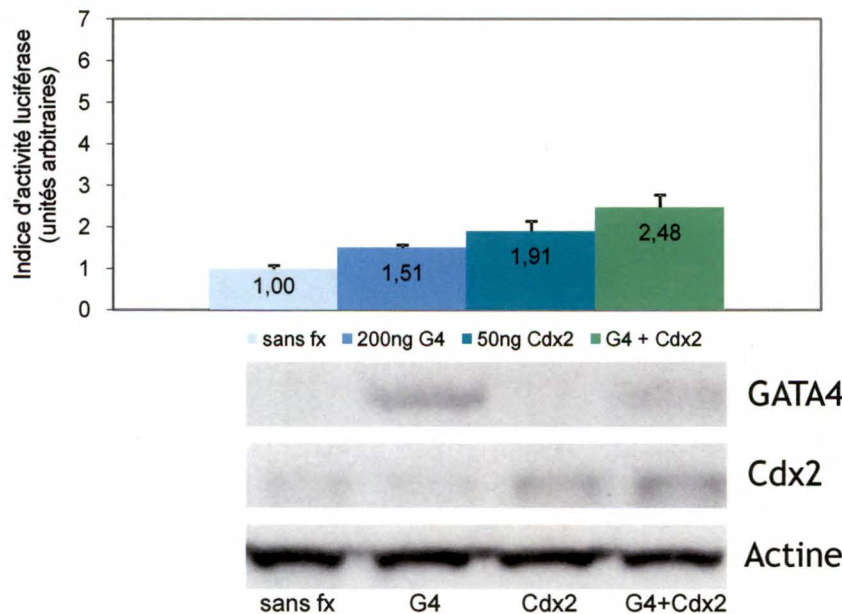
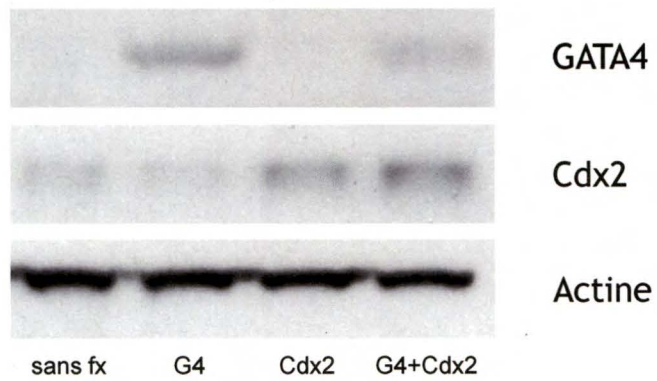
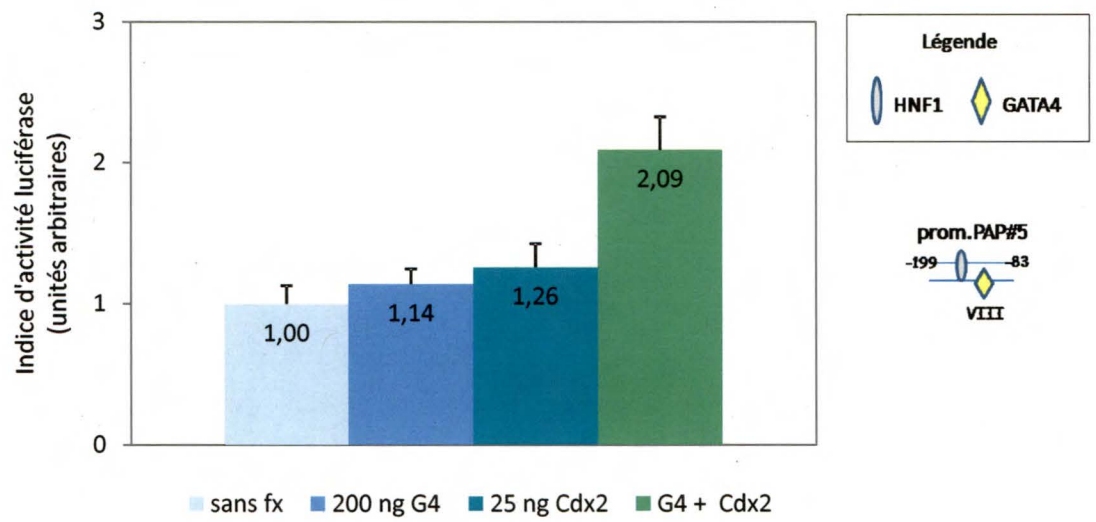


Figure 21. GATA4 et Cdx2 activent de façon synergique la transcription du petit promoteur PAPI

Des cellules Caco-2/15 confluentes ont été cotransfectées en utilisant la Lipofectamine 2000 avec la construction promotrice PAP#5 ou le vecteur vide pGL3basic, en plus de SV40-*Renilla*, et différentes combinaisons des vecteurs d'expression pour GATA4 (G4 : 200 ng) et Cdx2 (25 ng). Les résultats obtenus sont rapportés en termes d'induction de l'activité (moy \pm SEM) par rapport à la condition de transfection sans facteur de transcription et sont rationalisés par rapport à l'activité de base obtenue avec les constructions pGL3basic sans promoteur ajouté. Les résultats sont représentatifs de quatre expériences effectuées en triplicata.

Les niveaux d'expression des facteurs de transcription GATA4 et Cdx2 ont été validés par immunobuvardage de type western, avec les anticorps spécifiques pour chacun des facteurs de transcription, sur une combinaison des triplicatas des extraits des différentes conditions. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.



6. Analyse de l'expression de PAPI et GATA4 en culture cellulaire sous stress inflammatoire

Puisque la protéine PAPI est connue pour avoir une expression fortement activée lors de maladies inflammatoires intestinales (GIRONELLA et al, 2005 ; RECHRECHE et al, 1999 ; MOTOO et al, 1999), nous avons voulu savoir si un phénomène semblable se produisait lors de l'induction d'un stress inflammatoire dans des cellules d'origine intestinale. À cet effet, il est connu que le LPS, un lipopolysaccharide présent à la surface des bactéries Gram-négatives, peut activer le récepteur cellulaire TLR4 des cellules épithéliales, cette liaison menant à l'activation du facteur de transcription NFκB et permettant l'expression de diverses cytokines inflammatoires (CHOW et al, 1999). Il a aussi déjà été démontré que le LPS, ainsi que le TNFα (*tumor necrosis factor*), un médiateur proinflammatoire produit par les entérocytes et les cellules immunes, peuvent induire un stress inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales IEC-6, via la translocation nucléaire de NFκB (De PLAEN et al, 2002).

Les cellules IEC-6/Cdx2 ont donc été cultivées en présence de LPS (composé bactérien) ou TNFα (cytokine proinflammatoire), pour 24 heures et les niveaux d'expression de PAPI ont ensuite été analysés par Q-PCR et comparés avec des cultures contrôles sans agent inflammatoire. Les résultats montrent une augmentation importante des niveaux d'ARNm de PAPI dans les conditions de stress inflammatoire, comparativement aux conditions contrôles (Fig. 22a). En comparaison, il n'y a aucune expression du gène PAPI dans les cellules IEC-6 indifférenciées stimulées ou non par le LPS ou le TNF (résultats non montrés).

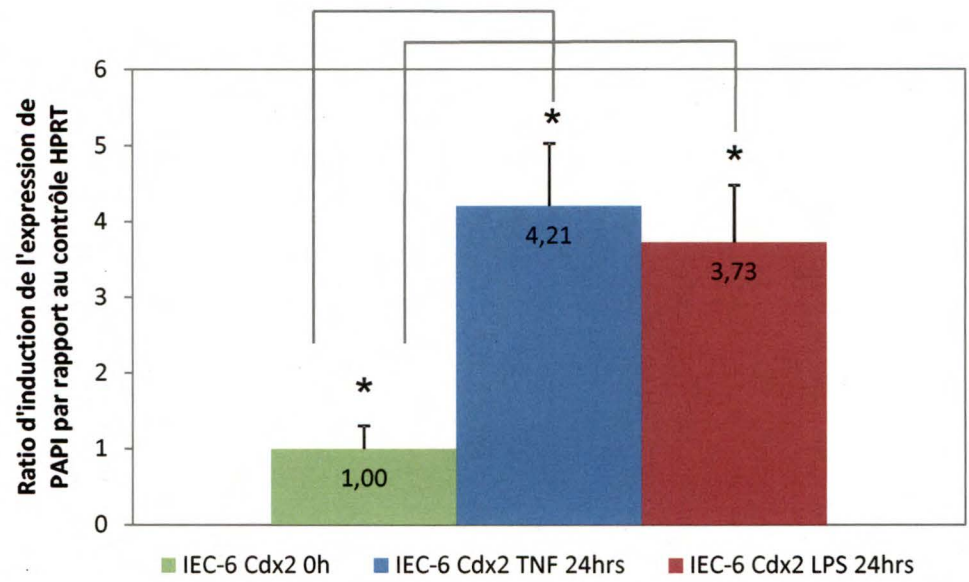
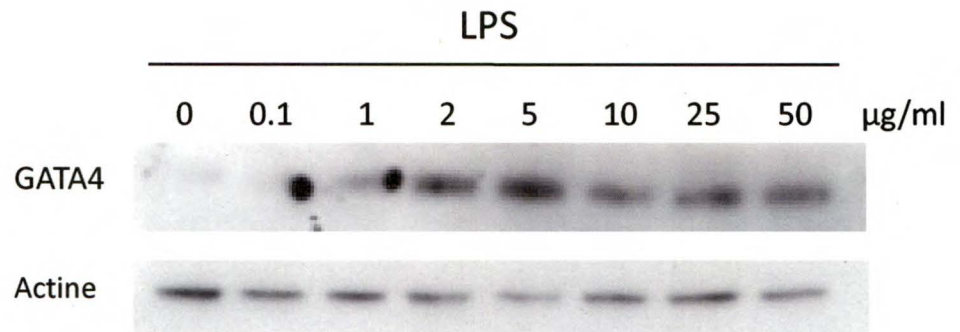
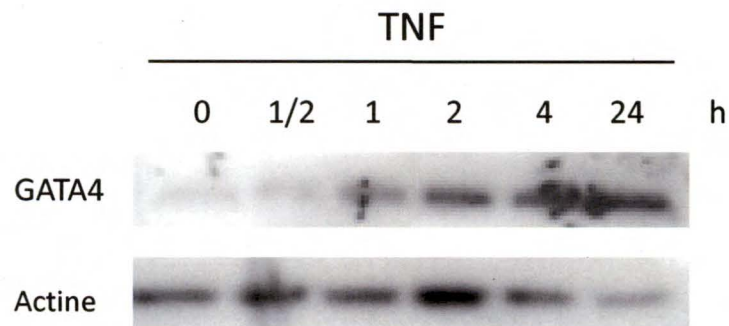
En ce qui concerne l'analyse de l'expression de GATA4, en condition de stress inflammatoire, les expériences réalisées dans les cellules IEC-6/Cdx2 en présence de LPS ou TNF α n'ont montré aucune modulation des niveaux protéiques de GATA4 en comparaison aux conditions contrôles (résultats non montrés). Cependant, des résultats préliminaires ont montré une hausse de l'expression protéique de GATA4 dans les cellules IEC-6 sous des concentrations croissantes de LPS (Fig. 22b). De même, une hausse de l'expression protéique de GATA4 a également été observée, et ce, de façon proportionnelle au temps d'incubation des cellules IEC-6 avec la cytokine proinflammatoire TNF α (Fig. 22c).

Figure 22. Expression de PAPI et GATA4 sous stress inflammatoire

A) Expression de PAPI dans les cellules IEC-6/Cdx2 suivant l'induction d'un stress inflammatoire. Détection par Q-PCR de l'expression de l'ARNm de PAPI dans les cellules IEC-6/Cdx2 induites pendant 24 heures à un stress inflammatoire par ajout de LPS ou de TNF α au milieu de culture. Des cellules IEC-6/Cdx2 non stimulées ont été récoltées au moment de la stimulation (0h). Les résultats sont rapportés en termes de ratio d'induction d'expression (moy \pm SEM) par rapport au contrôle 0h (P<0,05). Les niveaux d'expression du gène HPRT ont été utilisés comme référence pour ajuster les quantités d'ARN utilisées dans chaque échantillon. Les résultats sont représentatifs d'une cinétique effectuée en triplicata.

B) Expression de GATA4 dans les cellules IEC-6 suivant l'induction d'un stress inflammatoire par LPS. Immunobuvardage de type western effectué avec un anticorps spécifique dirigé contre GATA4 sur des extraits de protéines totaux de cellules IEC-6 soumises à un stress inflammatoire pendant 2 heures par l'ajout de LPS au milieu de culture à des quantités croissantes de 0 à 50 μ g/ml. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

C) Expression de GATA4 dans les cellules IEC-6 suivant l'induction d'un stress inflammatoire par TNF. Immunobuvardage de type western effectué avec un anticorps spécifique dirigé contre GATA4 sur des extraits de protéines totales de cellules IEC-6 induites à un stress inflammatoire pendant 0 à 24 heures par ajout de TNF α à 10 ng/ml au milieu de culture. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées.

A**B****C**

7. Modèle murin transgénique d'expression ectopique de GATA4

Quelques modèles murins, concernant l'étude de GATA4, ont été développés par différents groupes de recherche. Comme il a été mentionné en introduction, l'élimination totale de GATA4 au niveau de l'organisme entier murin entraîne la mort embryonnaire avant le développement intestinal (MOLKENTIN et al, 1997 ; KUO et al, 1997). L'élimination spécifique au niveau intestinal provoque l'apparition d'un phénotype iléal au niveau des cellules jéjunales (BOSSE et al, 2006). Dans notre cas, nous avons tenté de produire une souris transgénique d'expression ectopique de GATA4, au niveau de l'épithélium intestinal complet (grêle et côlon). Pour ce faire, deux souris transgéniques ont été utilisées pour des croisements, soit la souris VilCre, disponible commercialement, et la souris loxP.STOP.loxP-GATA4, que nous avons créé à partir de notre construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4.

La validation de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 utilisée a été réalisée par cotransfection en combinaison avec un vecteur d'expression de la Cre dans les cellules 293T. L'immunobuvardage d'extraits protéiques totaux des essais de cotransfection a montré l'expression de GATA4 seulement dans la condition de cotransfection en présence des deux plasmides CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 et Cre (Fig. 23).

La souris transgénique loxP.STOP.loxP-GATA4 a été produite par microinjection d'une portion linéaire de la construction d'intérêt comportant les éléments CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4, et ce, dans des ovocytes non-fécondés. Ces ovocytes ont ensuite été implantés à une mère porteuse et fécondés. Par génotypage il a été possible

d'identifier, parmi les 100 souris nées, que 21 d'entre elles avaient intégré la construction d'intérêt (Fig. 24a). La technique de Southern a permis d'évaluer, parmi les souris pré-identifiées, celles possédant le plus grand nombre de copies intégrées de la construction (Fig. 24b). De ces résultats, la souris transgénique loxP.STOP.loxP-GATA4 #600 a été utilisée pour effectuer les croisements avec les souris VilCre. Des essais d'extractions protéiques suivis d'analyse par immunobuvardage ainsi que des essais d'immunolocalisation n'ont permis aucune détection de l'expression de base de GATA4 chez les souris doubles transgéniques résultantes de ces croisements. Aussi, des analyses par RT-PCR semi-quantitatif, d'extraits d'ARN provenant du jéjunum et du côlon d'une souris double transgénique, n'ont pas permis d'observer une expression appréciable de GATA4 ectopique (Fig. 25c).

Figure 23. Validation de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4

Immunobuvardage de type western effectué avec un anticorps spécifique contre GATA4 sur des extraits de protéines totales de cellules 293T cotransfectées avec les constructions CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 et plentiCre. Comme contrôle négatif, des extraits de protéines totales effectuées sur des cellules 293T non-transfectées, des cellules transfectées avec la construction plentiCre seule ou avec la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 seule ont été utilisés. L'actine a été visualisée afin de s'assurer de la constance des quantités de protéines migrées. La production de la protéine GATA4 est dépendante de la présence conjointe des vecteurs CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 et plentiCre.

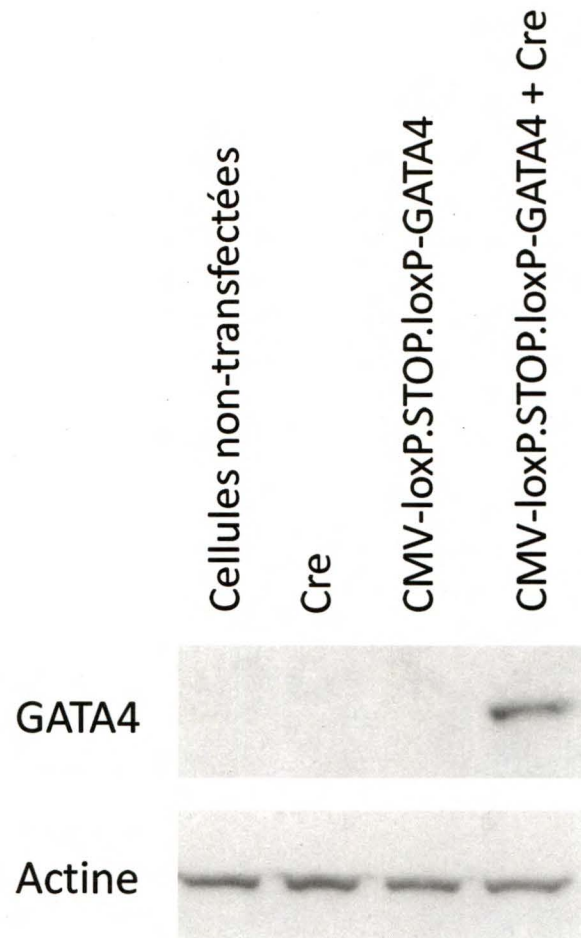
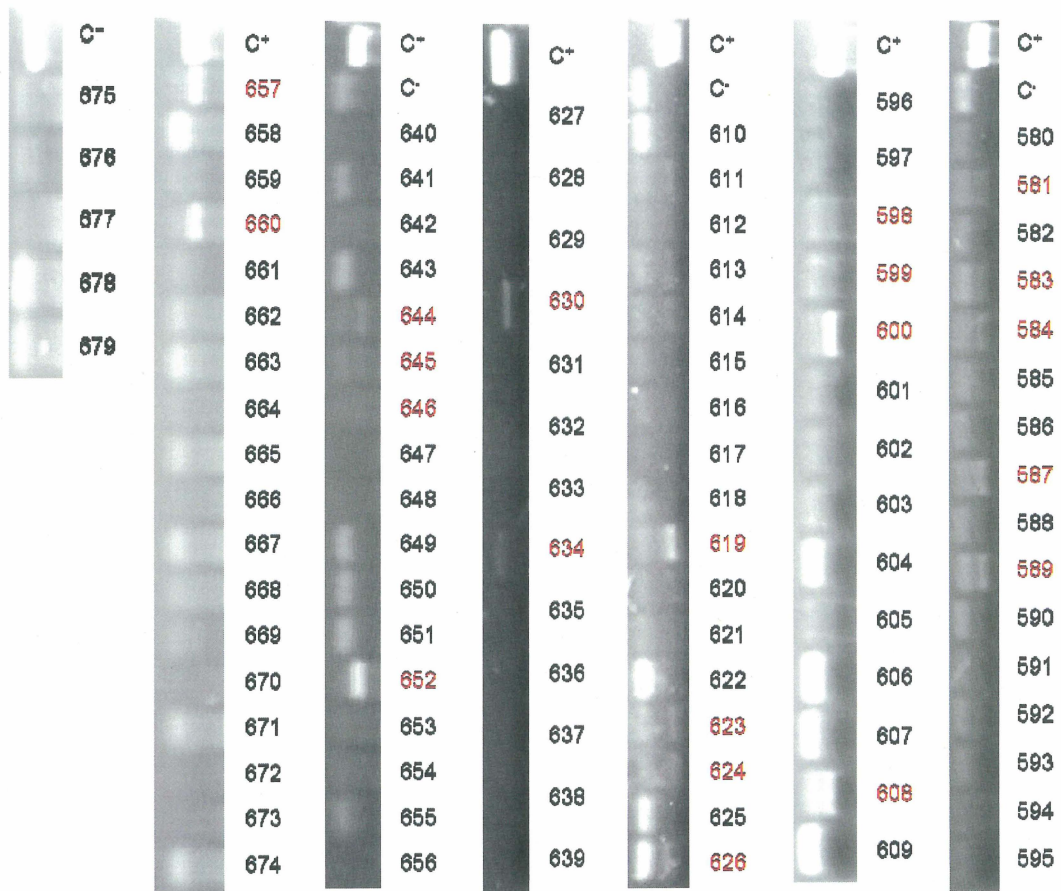


Figure 24. Identification des souris positives loxP.STOP.loxP-GATA4

A) Par géotypage. PCR réalisé avec les extraits d'ADN génomique des queues des 100 souris nées suite à la microinjection pronucléaire avec la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 pour détecter la présence de l'intégration de cette construction. L'amplification a été réalisée avec les amorces G4gnt2 qui s'hybrident dans la région 3' de GATA4 et en aval du cDNA de GATA4 dans ladite construction. L'amplification à partir de l'ADN de la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GATA4 a servi de contrôle positif (C⁺) et une amplification sans ADN a servi de contrôle négatif (C⁻). Les 100 souris ont été numérotées de 580 à 679 et celles dont l'amplification est positive sont représentées avec un numéro rouge.

B) Par Southern. Buvardage de type Southern effectué avec une sonde radioactive complémentaire de l'ADN loxP.STOP.loxP hybridé sur l'ADN génomique digéré de 10 des 21 souris positives loxP.STOP.loxP-GATA4 identifiées par géotypage. Comme contrôle positif la construction CMV-loxP.STOP.loxP-GAGTA4 digérée XhoI a été migrée à deux dilutions différentes (1/20 et 1/10). Les flèches indiquent la position de la zone d'hybridation de la sonde. La souris #600 est la seule souris positive de ce buvardage Southern. L'ADN génomique des onze autres souris positives identifiées par géotypage a également été analysé (données non figurées) et aucun n'a montré d'hybridation avec la sonde.

A



B

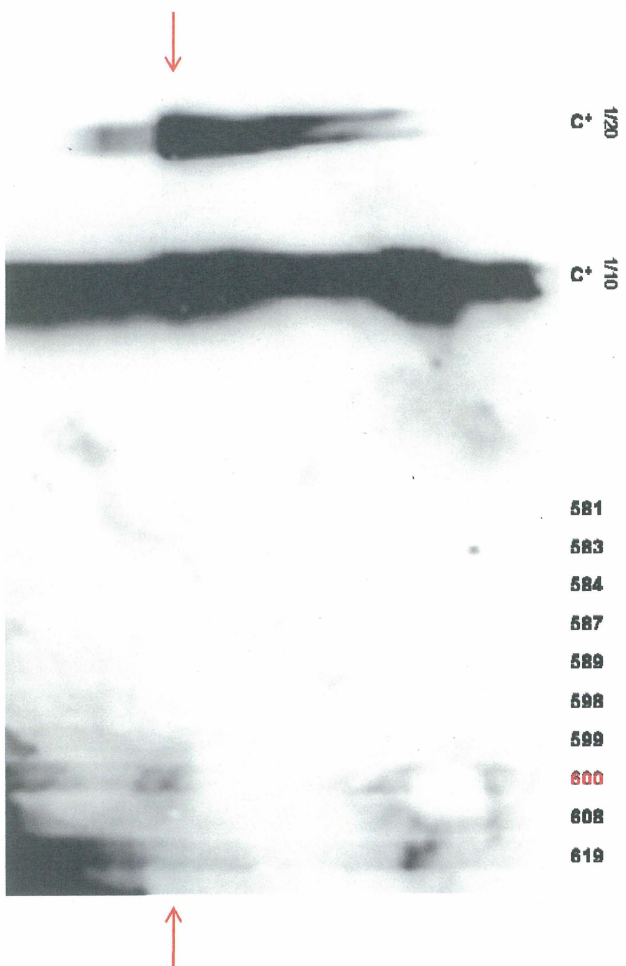


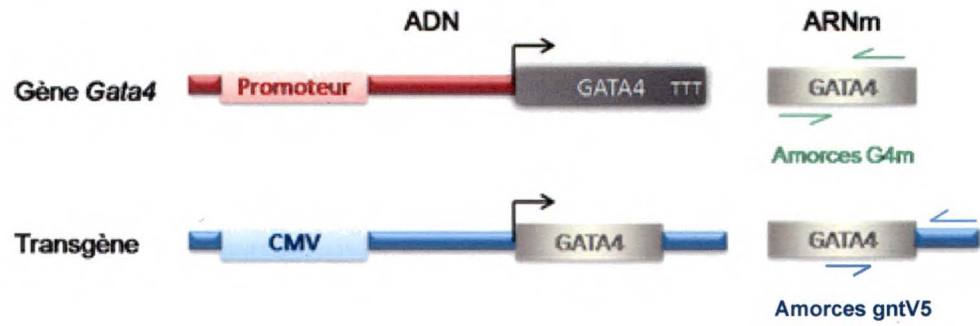
Figure 25. Analyse des souris doubles transgéniques loxP.STOP.loxP-GATA4 / Cre

A) Schéma des amorces utilisées. Deux duos d'amorces ont été utilisés pour l'amplification par RT-PCR de l'expression de GATA4. La première paire (G4m) amplifie l'ARNm de GATA4 transcrit du gène *Gata4* murin et du transgène GATA4. Ces amorces s'hybrident dans la région codante du gène compris dans l'ARNm. La deuxième paire (gntV5) amplifie spécifiquement l'ARNm de GATA4 transcrit à partir du cDNA de GATA4 inclus dans le transgène. Ce transgène ne possède pas de signal de polyadénylation (TTT) donc l'ARNm résultant comportera une portion supplémentaire en 3' comparativement à l'ARNm provenant du gène *Gata4*. Ainsi, la paire d'amorces gntV5 s'hybride dans cette portion en aval du cDNA de GATA4, correspondant à l'épitope V5, et dans la région 3' du cDNA.

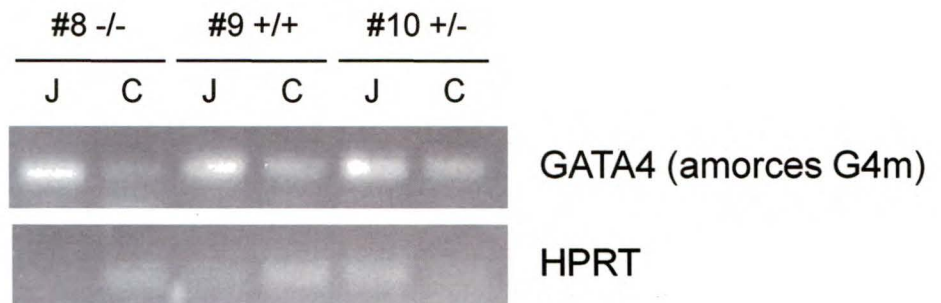
B) Expression de GATA4 endogène. RT-PCR semi-quantitatif, réalisé avec des extraits d'ARN de jéjunum et de côlon de souris nées du croisement entre souris villine-Cre et loxP.STOP.loxP-GATA4. L'amplification a été réalisée avec les amorces G4m. Par génotypage, avec les amorces G4gnt8 et Cre, il a été déterminé que la souris #8 (-/-) est négative pour le transgène GATA4 et négative pour la Cre, la souris #9 (+/+) est positive pour les deux et la souris #10 (+/-) est positive seulement pour le transgène GATA4. L'expression du gène HPRT a également été analysée afin de s'assurer de la constance des quantités d'ARN utilisées.

C) Expression de GATA4 ectopique. RT-PCR semi-quantitatif réalisé avec les mêmes extraits d'ARN que ceux utilisés en B. L'amplification a été réalisée avec les amorces gntV5. L'ADN génomique extrait d'une souris à génotype positif pour le transgène GATA4 et la Cre a été utilisé comme contrôle positif ($S^{+/+}$). Tandis que l'ADN génomique extrait d'une souris à génotype négatif pour le transgène GATA4 et la Cre a été utilisé comme contrôle négatif de la spécificité des amorces ($S^{-/-}$). Aussi une amplification a été réalisée sans cDNA et sans ADN génomique comme contrôle négatif d'amplification (Ctr).

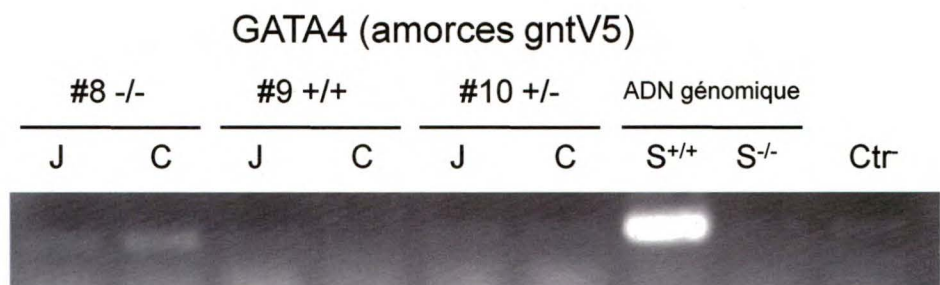
A



B



C



Discussion

1. Implication de GATA4 dans la différenciation cellulaire

L'hypothèse de départ de ce projet de recherche stipulait que le facteur de transcription GATA4 est impliqué dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Pour valider cette hypothèse, nous nous sommes fixés l'objectif d'identifier de nouveaux gènes cibles de GATA4 au sein de l'épithélium digestif. Pour ce faire nous avons choisi d'utiliser une méthode d'interférence à l'ARN et de cloner trois shGATA4. La validation de nos outils shRNA(GATA4) a donc représenté une étape essentielle de ce projet. À cet effet, la baisse d'expression protéique de GATA4 obtenue dans les cultures shGATA4 à court terme (Fig. 10), corrélée par une baisse de 57 % des niveaux d'ARNm de GATA4 (Fig. 12a), confirme la validité de l'outil de répression d'expression de GATA4. Aussi, cette diminution d'expression est également observée dans la liste des cibles exprimées à la baisse obtenues par l'analyse *Affymetrix* (Fig. 12b). De plus, l'outil shRNA s'est avéré être stable dans le temps, comme le montre les cultures à long terme utilisant les shGATA4 #1 ou #3 (Fig. 11a), ainsi que les co-cultures utilisant les mêmes shRNA (Fig. 11b). Finalement, l'expérience « *récupération* GATA4 » a montré, la réversibilité de l'outil shGATA4 (Fig. 15c). Car, une baisse d'expression de GATA4, par l'outil shGATA4, peut être compensée par infection rétrovirale à l'aide d'une construction d'expression d'une protéine GATA4 (mutG4) résistante à la régulation négative du shRNA en

question. Nos outils, spécialement le shGATA4 #3, sont donc fonctionnels et valables pour le présent projet de recherche.

Les outils élaborés et les expériences effectuées n'ont pu, cependant, répondre clairement à notre hypothèse de départ. En effet, les cultures à long terme de cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4 sur plastique n'ont montré aucune variation dans l'expression protéique des marqueurs de différenciation cellulaire Cdx2 et PPAR γ (Fig. 11a). De plus, dans ces mêmes cultures, nous avons tenté de déterminer des variations des niveaux d'ARNm, par RT-PCR semi-quantitatif (données non montrées), pour certains marqueurs de différenciation, tels la SI et la lactase. Toutefois, il nous est apparu impossible de détecter la présence de ces ARNm, et ce, même dans nos conditions de culture contrôle, nous laissant croire que nos extraits d'ARN n'étaient pas suffisamment concentrés pour cela. Aussi, les résultats d'analyse *Affymetrix* (Fig. 12b) ne montrent aucune modulation de cibles potentielles de GATA4 impliquées dans le processus de différenciation cellulaire. Cependant, les co-cultures effectuées avec le shGATA4 #3, montrant une plus forte efficacité de réduction de l'expression de GATA4 que celles effectuées avec le shGATA4 #1, démontre une baisse d'expression protéique de Cdx2 (Fig. 11b).

Il est important de noter également, qu'au cours de ce projet de recherche, une étude publiée utilisant un modèle de souris transgénique, où l'expression de GATA4 est inhibée spécifiquement au niveau intestinal, n'a montré aucun lien potentiel entre GATA4 et la différenciation des cellules épithéliales intestinales (BOSSE et al, 2006). Néanmoins, il serait faux de rejeter systématiquement ce lien, puisque cette étude n'a été menée que sur des individus adultes et seulement 14 jours après le début de

l'invalidation de GATA4. Une étude semblable où l'invalidation spécifique se ferait à partir du développement embryonnaire de l'intestin pourrait possiblement mener à des résultats différents.

Donc, à la lumière de nos résultats et des données connues jusqu'à maintenant, l'implication de GATA4, ou son absence d'implication, dans le processus de différenciation cellulaire demeure à être démontrée clairement.

Pour ce faire, nous proposons d'effectuer d'autres co-cultures, avec les cellules IEC-6/Cdx2 shGATA4, et de vérifier les niveaux d'expression en ARNm et en protéines de divers marqueurs de différenciation (SI, lactase...). Aussi, nous voulons analyser ces co-cultures en microscopie électronique, dans le but d'observer s'il y a des différences dans la morphologie de ces cellules (ex : polarisation des cellules, présence d'une bordure en brosse et de jonctions cellulaires, etc.).

2. PAPI, une nouvelle cible génétique de GATA4

L'analyse *Affymetrix*, effectuée sur les cultures IEC-6/Cdx2 shGATA4 à court terme, nous a permis d'identifier une nouvelle cible dépendante de l'expression de GATA4, soit le gène PAPI. Ce qui nous a amené à postuler une seconde hypothèse, stipulant que le gène PAPI est une cible du facteur de transcription GATA4. Jusqu'à maintenant, seulement une étude a exploré le lien entre le facteur GATA4 et l'inflammation intestinale. Cette étude a démontré le potentiel régulateur de GATA4 sur l'expression des C/EBP, facteur de transcription impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire (TURGEON et al, 2008). Dans le cas présent, GATA4 serait impliqué directement dans la régulation d'un effecteur de la réponse inflammatoire,

soit PAPI (GIRONELLA et al, 2005). Cette avenue s'avère donc des plus intéressantes à explorer par son potentiel innovateur. Les travaux effectués par la suite ont, de ce fait, porté sur l'étude de la relation entre GATA4 et PAPI dans le contexte des cellules épithéliales intestinales. En commençant par l'établissement de la preuve que le facteur de transcription GATA4 est bien un régulateur du gène PAPI.

Tout d'abord, la validation de cette nouvelle cible, par RT-PCR semi-quantitatif effectué sur des cultures IEC-6/Cdx2 shGATA4 à long terme (Fig. 13), nous a permis de valider que les cellules IEC-6/Cdx2 de base peuvent induire l'expression du gène PAPI en cours de différenciation. Cette observation laisse donc supposer que les cellules absorbantes permettent la production de PAPI, le modèle cellulaire épithélial intestinal IEC-6/Cdx2 étant principalement constitué de cellules absorbantes (SUH et TRABER, 1996). Donc, au niveau de l'épithélium intestinal, les cellules de Paneth ne seraient pas les seules cellules pouvant produire cette protéine de stress (MASCOTRA et al, 1995). Une étude différentielle de l'expression génique de l'axe crypte-villosité allant également dans ce sens (STEGMANN et al, 2006).

En ce qui concerne les autres membres de la famille GATA présents dans l'épithélium intestinal, soit GATA5 et GATA6, il est bon de se rappeler que ces facteurs ne sont que très faiblement exprimés dans le modèle cellulaire IEC-6/Cdx2. Lors de la réduction de l'expression de GATA4 dans ce modèle, par l'utilisation de l'outil shRNA(GATA4), l'expression des protéines GATA5 et GATA6 n'a pas été analysée. Principalement parce que les anticorps disponibles pour ces facteurs ne sont que très peu efficaces. Un effet compensatoire de GATA5 et GATA6 pour combler la baisse de l'expression de GATA4 serait-il envisageable ? À première vue oui. Nous avons

même songé à le valider, particulièrement suite aux résultats concernant la recherche d'une implication potentielle de GATA4 avec la différenciation cellulaire. Cependant, en ce qui concerne le lien entre GATA4 et PAPI, l'hypothèse d'un effet compensatoire n'a pas vraiment sa place, puisque nous observons effectivement une baisse de l'expression de PAPI en absence de GATA4 (résultats *Affymetrix* et culture cellulaire à long terme shRNA(GATA4)). À notre avis, le régulateur GATA privilégié de PAPI est donc GATA4.

À l'aide de l'expérience « *récupération* GATA4 », nous avons voulu déterminer l'expression de PAPI (données non montrées), pour évaluer sa relation avec les variations d'expression de GATA4. Nos résultats, découlant d'une première expérience, ont montré une expression élevée de PAPI dans chacune des conditions d'infection (lentivirale seule, rétrovirale seule ou lentivirale + rétrovirale), sans lien avec l'expression de GATA4. Cette hausse d'expression pourrait être relative aux conditions précises de cette expérience, c'est-à-dire à la double infection des cellules. À cet effet, nous avons remarqué une mort cellulaire importante lors des dites infections. Ces infections ayant été réalisées sur des populations à faible confluence et dans le cas des doubles infections, sur un laps de temps très court. Ces conditions expérimentales pourraient expliquer, selon nous, la mort cellulaire observée. En ce qui concerne l'expression élevée de PAPI, nous croyons qu'elle est relative à l'état des cellules, PAPI étant connu pour être une protéine de réponse au stress cellulaire. Nous prévoyons retenter l'expérience « *récupération* GATA4 », toujours dans le but d'observer si l'expression de PAPI est relative à celle de GATA4. Mais cette fois, en établissant tout d'abord des lignées stables shGATA4 qui seront par la suite infectées

par la construction rétrovirale mutG4, le choc infectieux en sera alors probablement diminué. Les résultats obtenus lors de ce premier essai de «*récupération* GATA4 », ne contredisent donc pas, selon nous, la précédente relation observée concernant la régulation de l'expression de PAPI par GATA4.

2.1. *In vitro*, GATA4 peut lier le promoteur du gène PAPI

L'analyse informatique du promoteur du gène PAPI de rat, sur une portion de 1260 pb en amont du site d'initiation de la transcription, a permis l'identification, entre autres, de huit sites potentiels de liaison des protéines GATA (Fig. 16a). Par gel de rétention, la liaison *in vitro* de GATA4 sur ces huit sites a été démontrée (Fig. 17). Les sites II et V à VIII montrent une liaison plus forte, puisque les complexes de rétention, visualisés sur gel, étaient plus importants dans les essais avec les sondes relatives à ces sites. Ainsi parmi ces cinq sites à forte liaison, quatre (II, VI, VII, VIII) possèdent le site consensus GATA complet, expliquant possiblement leur pouvoir de liaison accru.

Les liaisons observées peuvent être associées à la protéine GATA4, car l'utilisation d'extraits protéiques nucléaires de transfection contrôle, sans expression de GATA4 (Fig. 16b), ne montre pas ou très peu de formation de complexe de rétention sur gel (condition 2, Fig. 17). Puisque les cellules 293T n'expriment pas de base le facteur GATA4, les complexes faibles observés dans les conditions 2 (pcDNA + sonde), pour les sites GATA II et V à VIII, peuvent laisser supposer la présence de protéines GATA, autres que GATA4, dans les cellules 293T de base. Pour valider, avec certitude, la spécificité de la liaison de GATA4, nous pourrions effectuer une

expérience de gel de rétention en présence d'un anticorps spécifique contre GATA4 (*supershift*). Aussi, il serait intéressant d'effectuer une immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*), afin de démontrer la capacité *in vivo* de GATA4 à promouvoir l'accessibilité de complexes transcriptionnels de base sur la chromatine au niveau du promoteur du gène PAPI.

Finalement, l'analyse du promoteur du gène PAPI humain a permis l'identification de deux sites potentiels d'interaction de la protéine GATA4. L'environnement d'un de ces sites correspondrait en partie à celui du site GATA II fonctionnel du promoteur du gène PAPI de rat. Ce qui laisse supposer la possibilité de liaison de GATA4 sur le promoteur humain de PAPI. À cet effet, il serait fort intéressant d'approfondir la liaison de GATA4 et son activité transcriptionnelle sur l'homologue humain de ce promoteur, car inutile de rappeler que nos recherches visent d'abord et avant tout une meilleure compréhension du métabolisme de l'espèce humaine.

2.2. GATA4 active la transcription du gène PAPI

Très peu de régulateurs du gène PAPI sont connus jusqu'à ce jour. Bien qu'au niveau intestinal, une étude ait rapporté le potentiel activateur de Cdx1 sur la transcription du gène PAPI, dans un contexte de promotion de la croissance cellulaire (MOUCADEL et al, 2001), la régulation transcriptionnelle de ce gène n'est pas encore définie.

À ce sujet, nos essais transcriptionnels ont permis de démontrer que GATA4 a la capacité d'activer la transcription du gène PAPI. Il agit de façon quantité dépendante, sur la portion de 1260 pb du promoteur de ce gène (Fig. 19b). Cette activation transcriptionnelle a été observée, à plus d'une reprise, dans les cellules Caco-2/15

confluentes. Fait intéressant, lors de l'utilisation de cellules Caco-2/15 sous confluentes, pour les essais transcriptionnels, l'effet activateur de GATA4 était beaucoup plus faible (données non montrées). Nous savons que l'expression protéique des cellules Caco-2/15 change avec la différenciation qui est enclenchée à l'atteinte de la confluence. Par exemple, l'expression de Cdx2 (BOULANGER et al, 2005) et HNF-1 α (BOUDREAU et al, 2001) augmente dans les cellules Caco-2/15 confluentes. Puisque ces facteurs de transcription sont des partenaires d'interaction reconnus de GATA4, ainsi que des collaborateurs transcriptionnels dans le cas de la SI (BOUDREAU et al, 2002). Nous avons donc supposé que le niveau de confluence des cellules Caco-2/15 pouvait être en lien avec la capacité transcriptionnelle de GATA4 sur le promoteur du gène PAPI. En plus, nous savons que ce promoteur contient des sites potentiels d'interaction pour Cdx2 et HNF-1 α (Fig. 16a). Dans cette optique, nous avons donc tenté des essais transcriptionnels avec la présence combinée de GATA4 et Cdx2.

2.3. Cdx2 est un partenaire de GATA4 dans l'activation transcriptionnelle du promoteur PAPI

L'effet synergique de GATA4 et Cdx2 a tout d'abord été démontré, à trois reprises, sur le promoteur complet du gène PAPI (construction #1) (Fig. 19c). Il a également été démontré, encore une fois à plusieurs reprises, sur le petit promoteur du gène PAPI (Fig. 21). L'étude avec ce petit promoteur, suggère que cet effet synergique obtenu avec Cdx2 ne passe pas par une interaction directe avec le promoteur PAPI. En effet, la construction du petit promoteur ne contient pas de site potentiel d'interaction

pour Cdx2. Notre hypothèse est donc que l'effet de Cdx2, sur l'activation du petit promoteur du gène PAPI, passe par une interaction de cette protéine avec GATA4, et qu'ensemble ils interagissent ensuite sur le site GATA VIII du promoteur en question. À cet effet, il est connu que ces deux facteurs de transcription peuvent interagir physiquement (BOUDREAU et al, 2002). La suite logique de ces expériences, est de tenter des essais transcriptionnels en présence combinée de GATA4, Cdx2 et aussi HNF-1 α . Nous observerons alors peut-être, une activation transcriptionnelle supérieure à celle obtenue jusqu'à maintenant. En mutant le site GATA, de la construction #5, nous pourrions aussi déterminer la nécessité d'un tel site pour l'effet transcriptionnel de GATA4. Et déterminer, par la même occasion, si l'effet de HNF-1 α passe par ce site ou par son site d'interaction potentielle présent sur cette construction.

Nos essais transcriptionnels nous ont également permis d'observer une baisse systématique de l'expression de GATA4 lors de son expression combinée avec le facteur Cdx2. L'analyse de tous nos résultats bruts (activité luciférase firefly et rénilla) a fait ressortir une tendance, soit la baisse de l'activité luciférase rénilla, utilisée comme standard interne, lors de la présence de Cdx2. Cela laisse supposer que ce facteur aurait une influence sur l'efficacité des transfections, entraînant ainsi une diminution globale de l'expression des facteurs de transcription à l'étude.

2.4. Élément répresseur présent sur le promoteur du gène PAPI

Des résultats préliminaires, obtenus des essais transcriptionnels réalisés avec les constructions #2, 3 et 4 du promoteur du gène PAPI (Fig. 20a-c), suggèrent, en

premier lieu, un effet additif des facteurs de transcription GATA4 et Cdx2 combinés, et ce, pour les constructions #2 et 4. En second lieu, ces essais ont apporté l'idée de la présence potentielle d'un élément répresseur contenu sur le promoteur du gène PAPI entre -541 et -423 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Cet élément expliquerait la perte d'activité transcriptionnelle pour la construction #3. L'effet de cet élément répresseur pourrait être compensé par la présence des sites GATA II et V, retrouvés dans les constructions #1 et 2, où l'on retrouve une activité transcriptionnelle appréciable. Tandis que le retour de l'activité transcriptionnelle avec la construction #4, nous laisse supposer que l'élément répresseur en question n'est plus présent. Bien entendu, ces essais transcriptionnels doivent être répétés, car l'absence d'activité transcriptionnelle pour la construction #3 pourrait également être expliquée par la faible surexpression de Cdx2 obtenue dans cette expérience (Fig. 20b).

Si l'effet répresseur de la région -541 et -423 pb est répété, des mutations dirigées vers cette région pourraient nous aider à cibler plus précisément l'élément responsable.

2.5. Implication du duo GATA4-PAPI dans la réponse cellulaire à un stress inflammatoire

Bien que plusieurs facteurs impliqués dans les MII ont été identifiés jusqu'à maintenant, l'étiologie de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse n'est toujours pas mise à jour. Plusieurs équipes de recherche tentent donc d'approfondir nos connaissances au sujet de la régulation moléculaire sous-jacente à ces maladies

inflammatoires de l'intestin. À cet effet, le premier gène de susceptibilité relié à la maladie de Crohn fut découvert en 2001. Il s'agit d'une mutation dans le gène NOD2/CARD15 (HUGOT et al, 2001 ; OGURA et al, 2001 ; SCALDAFERRI et FIOCCHI, 2007). NOD2 étant une protéine cytosolique qui reconnaît un dipeptide bactérien muramyl, un composant majeur de la paroi cellulaire bactérienne. La variation dans NOD2/CARD15 affecte sa capacité de reconnaissance des composants bactériens et régule négativement la réponse via NF κ B. Cependant, le résultat au niveau de la réponse immunitaire demeure en débat, s'agit-il d'une perte ou d'un gain d'activation ?

En ce qui nous concerne, nous nous intéressons à l'étude des facteurs de transcription présents au sein de l'épithélium intestinal qui pourraient réguler l'homéostasie épithéliale intestinale. Nous savons maintenant que le facteur de transcription GATA4 module la transcription du gène PAPI, lui-même impliqué dans la réponse inflammatoire reliée aux MII (GIRONELLA et al, 2005 ; RECHRECHE et al, 1999 ; MOTOO et al, 1999). Dans cette optique, est-ce que le duo GATA4-PAPI pourrait jouer un rôle dans la réponse cellulaire à un stress inflammatoire ? L'implication potentielle de GATA4 dans une réponse inflammatoire est une avenue totalement innovatrice. Pour répondre à cette question, nous devons d'abord analyser l'expression de ces deux joueurs lors de l'induction d'un stress inflammatoire cellulaire.

Premièrement, l'étude des cellules IEC-6, modèle de cellules cryptales indifférenciées sans expression de Cdx2 et avec des niveaux très faibles de GATA4, ne montrent aucune expression de base du gène PAPI (résultats non montrés). Lors de l'induction

d'un stress inflammatoire dans ces cellules, par ajout de LPS ou TNF α au milieu de culture, nous observons une induction de l'expression protéique de GATA4 (Fig. 22b et c). Toutefois, aucune activation transcriptionnelle du gène PAPI n'est détectée dans ces cellules stimulées (résultats non montrés). Nous supposons que l'expression génique de PAPI requiert un contexte cellulaire différencié, où un partenaire de GATA4, Cdx2 par exemple, doit être présent. À cet effet, les résultats d'essais transcriptionnels montrent bien le potentiel d'activation synergique sur le promoteur de ce gène en présence combinée de GATA4 et Cdx2.

Deuxièmement, les cellules IEC-6/Cdx2, modèle de cellules villositaires différenciées présentant une forte expression de GATA4 et Cdx2 (BOUDREAU et al, 2002), montrent de base, une expression du gène PAPI (Fig. 13). Lors de l'induction d'un stress inflammatoire dans ces cellules, encore une fois par ajout de LPS ou TNF α au milieu de culture, nous observons une hausse importante de l'expression du gène PAPI (Fig. 22a). Toutefois, l'expression protéique de GATA4 ne change pas durant la stimulation inflammatoire (résultats non montrés). À cet effet, il faut spécifier que l'expression de base de GATA4 dans les cellules IEC-6/Cdx2 est élevée. Dans cette disposition, il peut donc être superflu à la cellule d'augmenter l'expression protéique de GATA4. Selon nous, l'activation transcriptionnelle du gène PAPI, dans ce contexte cellulaire, passerait peut-être par une modification post-traductionnelle de GATA4. Cette modification aurait pour effet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de la protéine. De telles modifications de GATA4 ont été rapportées dans les études de ce facteur au niveau cardiaque. Par exemple, la phosphorylation de GATA4, en réponse à des stimuli qui induisent une hypertrophie cardiaque et/ou une insuffisance

cardiaque, entraîne une augmentation de la liaison à l'ADN et/ou de l'activité transcriptionnelle de celui-ci (LIANG et al, 2001 ; OKA et al, 2007).

Maintenant que nous avons démontré que l'expression de GATA4 et PAPI est modulable en contexte de stress inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales, nous voulons analyser la signalisation cellulaire responsable de cette régulation. À cet effet, il a été montré que le mécanisme protecteur de la dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse anti-inflammatoire qui diminue significativement, en autres, la sévérité des pancréatites, pouvait passer par la régulation positive de l'expression génique de PAP (KANDIL et al, 2006). Les hormones glucocorticoïdes sont également présentes au niveau intestinal, où elles joueraient, entre autres, un rôle dans la maturation de l'épithélium intestinal chez les rongeurs, qui survient au sevrage chez ces mammifères (GALAND, 1989 ; MENARD et al, 2005). Il est aussi connu, que chez les rongeurs, l'expression intestinale de PAPI est présente seulement à partir du sevrage (SANSONETTI et al, 1995 ; CASH et al, 2006). Également, l'expression de GATA4 chez la souris, au moment du sevrage, est stimulée par la dexaméthasone (OESTERREICHER et HENNING, 2004). Il serait donc très intéressant d'évaluer le lien entre la dexaméthasone, GATA4 et PAPI en réponse à un stress inflammatoire intestinal.

3. Le modèle murin double transgénique (loxP.STOP.loxP-GATA4 / Cre) et l'expression ectopique de GATA4

Malgré que nous n'ayons pu optimiser la détection de l'expression de la protéine GATA4 de base dans l'intestin grêle, par immunofluorescence ou par

immunobuvardage de type Western, nous croyons que les souris doubles transgéniques (loxP.STOP.loxP-GATA4 / Cre) obtenues ne mènent pas à une expression significative de GATA4 ectopique. Cette conclusion est basée à partir des résultats acquis par RT-PCR semi-quantitatif de l'analyse de l'expression de l'ARNm de GATA4 endogène et ectopique chez trois souris ; une double positive loxP.STOP.loxP-GATA4 / Cre (#9+/+), une positive seulement pour loxP.STOP.loxP-GATA4 (#10+/-) et une double négative (#8-/-). Premièrement, la détection de l'expression du gène HPRT a validé la quantité des ARNm présents dans les extraits de jéjunum et de côlon de ces animaux (Fig. 25b). Deuxièmement, nous avons détecté la présence d'ARNm de GATA4 dans le jéjunum de ces animaux et également, mais plus faiblement, dans leur côlon (Fig. 25b) et ce même pour les souris #8-/- et #10+/- qui ne possèdent pas le gène Cre. Ceci laissait supposer la contamination des extraits d'ADN par la construction loxP.STOP.loxP-GATA4. De plus, en utilisant des amorces permettant la discrimination entre les ARNm provenant de GATA4 endogène et ectopique, nous avons observé une expression faible d'ARNm de GATA4 ectopique dans le jéjunum et le côlon de la souris #8-/- et seulement une expression très faible pour les souris #9+/+ et #10+/- (Fig. 25c). Ces résultats appuient l'hypothèse d'une contamination des réactions de PCR, de plus le contrôle négatif (Ctr, sans cDNA) de l'amplification présente une faible expression (Fig. 25c). Finalement, l'amplification par PCR de l'ARNm de GATA4 ectopique pour la souris #9+/+ était même largement plus faible que celle obtenue de l'amplification à partir d'un extrait d'ADN génomique de souris double transgénique. Cette dernière donnée nous permet donc de croire, que s'il y a expression ectopique

de GATA4 dans nos souris doubles transgéniques, cette expression est vraiment très faible, et probablement en dessous du seuil permettant un effet physiologique sur l'épithélium intestinal grêle et colique. Dans ce cas, l'expression de GATA4 détectée à la figure 25b pour la souris #9+/+ pourrait même provenir d'une contamination des extraits d'ARN par de l'ADN génomique. Puisque le gène GATA4 ne possède pas d'intron, il est donc difficile de discriminer entre l'amplification obtenue par l'ADN de celle obtenue par l'ARNm de GATA4.

Jusqu'à maintenant, nous n'avons pu valider l'expression protéique de GATA4 dans notre nouveau modèle transgénique, et ce ni par immunobuvardage de type western ni par immunodétection. Des problèmes de dégradation rapide des extraits et d'efficacité de l'anticorps dirigé contre GATA4 pourraient être à l'origine de ces difficultés. De nouvelles conditions seront testées. Seulement, si suite à ces mises au point notre modèle double transgénique s'avère présenter un niveau non-significatif de protéines GATA4, au niveau de l'épithélium intestinal grêle et colique, nous envisagerons la création d'un autre modèle transgénique. Une approche différente sera alors préconisée, soit l'utilisation d'un promoteur intestin spécifique couplé au cDNA de GATA4, tel le promoteur de la SI.

La création d'un modèle transgénique est un projet de longue haleine. De plus, la réussite n'est jamais assurée. En effet, lors de l'intégration aléatoire de la construction d'intérêt dans le génome murin plusieurs scénarios peuvent se produire. La construction peut s'intégrer dans une région silencieuse du génome et ainsi ne mener à aucune expression ectopique. Si la construction s'intègre dans une région active transcriptionnellement, elle doit le faire en plusieurs copies consécutives pour amener

une expression significative du transgène. Donc, peu de copies intégrées constituent un autre problème possible. Dans notre cas, l'intégration dans une région silencieuse ou un faible nombre de copies intégrées pourraient expliquer la faible expression en ARNm détectée pour GATA4 ectopique. À cet effet, il serait utile de pouvoir approximer le nombre de copies intégrées à l'aide de l'analyse Southern. Aussi, le promoteur utilisé peut être mis en cause. En effet, le promoteur CMV est reconnu pour sa grande efficacité *in vitro*, cependant son efficacité *in vivo*, au niveau de l'épithélium intestinal n'a pas été démontrée. À cet effet, des études ont démontré que, malgré qu'il permet une forte transcription d'un transgène *in vivo* à court terme, le promoteur CMV devient silencieux quelques semaines après le transfert de gènes chez plusieurs modèles animaux (LÖSER et al, 1998). En fait, ce serait la méthylation et l'acétylation *in vivo* de ce promoteur qui le rendraient silencieux (GRASSI et al, 2003).

En terminant, comme vous aurez pu le constater, ce projet de recherche a requis l'utilisation de systèmes biologiques très hétérogènes. La majorité des expériences de culture cellulaire ont été réalisées avec le modèle de cellules épithéliales intestinales IEC-6/Cdx2, dont l'origine des cellules est le rat. Ce modèle est la seule lignée de cellules normales qui se différencient en culture, d'où sa très grande utilité. Cependant, ces cellules n'ont qu'un très faible potentiel de transfection. C'est pourquoi les cellules Caco-2/15 ont été utilisées pour les essais transcriptionnels, malgré leur origine cancéreuse. D'un autre côté, les études *in vivo* ont été réalisées chez la souris, car les modèles de rats transgéniques sont très rares, donc peu disponible et plus coûteux. Dans l'analyse de nos résultats nous devons donc toujours

garder en tête l'hétérogénéité de nos modèles. Un point d'intérêt à souligner, le gène PAPI semble faire partie des molécules très bien conservées entre les espèces. Entre autres, l'analyse de son promoteur nous a permis de constater la présence de sites GATA autant pour la molécule d'origine humaine, murine et de rat.

Conclusion

La présente étude a permis d'approfondir nos connaissances sur l'implication du facteur de transcription GATA4 dans le maintien de l'homéostasie épithéliale intestinale. Les résultats obtenus n'ont pu démontrer l'implication de GATA4 dans la différenciation cellulaire, mais, ils nous ont permis d'identifier une nouvelle cible transcriptionnelle de GATA4, soit le gène PAPI.

PAPI, pour *Pancreatitis Associated Protein I*, est une lectine antimicrobienne présente, entre autres, dans les intestins (CASH et al, 2006). Son expression est augmentée dans les cas de MII, possiblement pour agir comme frein à l'inflammation intestinale. Son effet anti-inflammatoire passant par le blocage de l'activation du facteur de transcription NFκB (GIRONELLA et al, 2005). Toutefois, le mécanisme de régulation transcriptionnelle de ce gène reste à être démontré, autant en contexte physiologique que pathologique.

Nous avons montré, que GATA4 peut lier fortement, *in vitro*, la région promotrice de 1260 pb du gène PAPI, sur cinq sites GATA présents dans cette région. Aussi, ce pouvoir de liaison de GATA4, sur le promoteur du gène PAPI, est indépendant de la présence de son partenaire d'interaction Cdx2. En plus de lier physiquement ce promoteur, GATA4 a le potentiel d'activer sa transcription, de façon quantité dépendante, dans les cellules Caco-2/15 confluentes. Également, le facteur de transcription Cdx2 agit comme partenaire de GATA4 dans l'activation

transcriptionnelle de ce même promoteur. En fait, la combinaison GATA4 et Cdx2 montre un effet synergique sur l'activation transcriptionnelle du promoteur du gène PAPI contenant les cinq sites d'interaction GATA et aussi sur le petit promoteur contenant seulement un site GATA. Ces résultats nous suggèrent donc que GATA4 est un modulateur direct du gène PAPI.

Enfin, nos résultats en condition de stress inflammatoire intestinal ont montré une modulation de l'expression de GATA4 et de PAPI, laissant croire à une possible implication de ce duo dans la signalisation inflammatoire de la cellule épithéliale intestinale. Cette implication potentielle de GATA4 dans la réponse inflammatoire est tout à fait innovatrice et très intéressante. Est-ce que GATA4 pourrait jouer un rôle au niveau des maladies inflammatoires de l'intestin ?

Finalement, le modèle de souris transgénique, que nous avons tenté de créer, ne nous a pas permis d'observer une expression ectopique d'ARNm de GATA4 significative au niveau intestinal. Quant aux niveaux protéiques du facteur, ils n'ont pu être analysés faute de mise au point adéquate des techniques utilisées. De nouveaux efforts à ce sujet seront mis en place pour déterminer la validité de notre modèle de souris double transgénique.

Perspectives

Pour faire suite à ce projet, plusieurs avenues intéressantes pourraient être envisagées. En particulier celles pouvant approfondir l'implication potentielle de GATA4 et PAPI dans la signalisation inflammatoire de la cellule épithéliale intestinale.

Tout d'abord, les modulations d'expression de GATA4 et PAPI, en contexte de stress inflammatoire, pourraient être répétées dans le nouveau modèle de co-culture épithélium-mésenchyme (LUSSIER et al, 2008). Ce modèle a, entre autres, l'avantage de présenter un niveau de différenciation plus élevé que les cellules IEC-6/Cdx2 (LUSSIER et al, 2008). Aussi, l'outil shGATA4 pourrait être utilisé dans ce contexte, pour déterminer si la présence de GATA4 est essentielle à PAPI, dans sa réponse au stress inflammatoire. Dans le même ordre d'idée, l'analyse de l'interrelation entre GATA4 et la hausse d'expression de PAPI en contexte de stress inflammatoire, pourrait être étudié en effectuant des essais transcriptionnels dans les cellules IEC-6/Cdx2 sous stimulation au LPS et au TNF α . Pour obtenir une population homogène, possédant les constructions des promoteurs et de surexpression des facteurs de transcriptions voulues, nous devrions premièrement créer des populations stables, car les cellules IEC-6/Cdx2 présentent une faible efficacité de transfection.

En se basant sur les modifications post-traductionnelles connues de GATA4 au niveau cardiaque (ex : phosphorylation) (LIANG et al, 2001 ; OKA et al, 2007). L'analyse de l'expression de GATA4 et PAPI en contexte de stress inflammatoire, a amené la

possibilité d'une telle modification de GATA4 dans cette situation. Si bien sûr l'interrelation entre GATA4 et PAPI est démontrée dans ce contexte, cette modification pourrait expliquer la hausse de l'activité transcriptionnelle de GATA4 sur le promoteur PAPI. Pour étudier cette éventualité, plusieurs expériences pourraient être réalisées. Premièrement, un gel de rétention, pour analyser la variation de la force de liaison de GATA4 sur le promoteur du gène PAPI, en contexte de stress inflammatoire ou non pourrait être fait. Deuxièmement, l'hypothèse de phosphorylation de GATA4 pourrait être étudiée. La phosphorylation potentielle de GATA4 pourrait d'abord être évaluée par immunobuvardage de type western. Soit en réalisant la migration des extraits protéiques sur un long gel, permettant une séparation optimale, et peut-être par le fait même, la visualisation d'un retard de migration correspondant à une forme phosphorylée de GATA4, en utilisant l'anticorps habituel contre GATA4. Ou bien, soit en utilisant un anticorps spécifique contre GATA4 phosphorylé, par exemple sur la sérine 105 (ab5245, Abcam, Cambridge, MA, USA). Dans la même optique, une immunoprécipitation effectuée à l'aide d'anticorps anti-PO₄, sur des extraits protéiques provenant de cellules stimulées au LPS ou TNF, suivit d'une analyse par immunobuvardage de type western utilisant l'anticorps habituel contre GATA4, permettrait aussi d'étudier le potentiel de phosphorylation de GATA4 dans ce contexte. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de kinase, par exemple le UO126 qui bloque l'activité de MEK, permettrait de vérifier s'il y a variation du potentiel de liaison de GATA4 à l'ADN ou de son potentiel d'activation transcriptionnelle du promoteur du gène PAPI lorsque sa phosphorylation potentielle est bloquée.

Ensuite, puisque l'expression de GATA4 en état inflammatoire, *in vivo*, dans des situations pathologiques (MII, cancer colorectal) n'est toujours pas connue, il serait très intéressant d'étudier cette avenue. Pour ce faire, des criblages de banques d'ARN, par Q-PCR, et des criblages de banques de tissus, par immunolocalisation, pourraient être effectués.

Enfin, l'immunolocalisation de la protéine PAPI dans l'axe crypte-villosité intestinal pourrait être réalisé, dans le but de déterminer si les cellules absorbantes peuvent produire cette protéine. Notre modèle de cellules IEC-6/Cdx2 a montré des résultats dans ce sens. De plus, des résultats préliminaires chez des souris injectées au LPS intrapéritonéalement et qui présentent une inflammation systémique, ont montré une hausse impressionnante de l'expression de PAPI au niveau de leur jéjunum et de leur côlon. L'immunolocalisation de cette protéine pourrait alors être explorée dans les intestins d'animaux sains comparativement aux intestins d'animaux stimulés au LPS.

Finalement, un collaborateur a récemment accepté de nous fournir la souris GATA4 knock-out, intestin spécifique, qu'il a nouvellement mise au point (OKA et al, 2006). En complément des études de métabolisme qu'ils ont effectuées, l'étude de la réponse à un stress inflammatoire chez ces animaux pourrait être analysée. Sera-t-elle affectée par la perte d'expression de GATA4 ? Est-ce que l'expression de PAPI sera tout de même induite au niveau intestinal ? Plusieurs questions pourront être étudiées à l'aide de ce nouveau modèle murin et permettront d'explorer le nouveau rôle, à ce jour non suspecté, de GATA4 à participer à la réponse inflammatoire intestinale.

Remerciements

La réalisation d'une maîtrise et l'écriture d'un mémoire sont des projets enrichissants, mais également très exigeants. La présence d'un patron stimulant, de collègues disponibles et serviables, de parents attentionnés et d'amis encourageants m'apparaît aujourd'hui comme étant un élément indispensable à ma réussite.

Premièrement, merci à mon directeur de recherche, le professeur François Boudreau. Merci de prendre le temps d'encourager tes « troupes », de nous féliciter pour nos réussites, des plus grandes au plus petites, merci de toujours nous accueillir dans ton bureau avec le sourire et de prendre à cœur que notre formation soit la meilleure qui soit. Poursuis ton excellent travail.

Merci aussi à mes collègues de travail : Isabelle Fréchette, Christine Jones, Carine Lussier, Jean-Philippe Babeu, Sébastien Mongrain, Mathieu Darsigny et Geneviève Doyon. Certains ont contribué à ma formation par leurs expertises, leurs conseils et leurs aides techniques, d'autres par leurs encouragements et leurs bons mots. Bref, ce fut un plaisir de partager ces heures de travail avec vous tous. C'est une belle équipe qui travaille pour le labo Boudreau ! Un merci particulier à Mathieu Darsigny et Stéphanie St-Jean qui ont réalisé les inductions de stress inflammatoires (LPS, TNF) dans les cellules IEC-6 et qui m'ont fourni les membranes d'immunobuvardage western qui m'ont permis d'analyser l'expression protéique de GATA4 dans ce contexte. Merci aussi à Jordan Pelletier, stagiaire dans le laboratoire du Dr. Boudreau

à l'hiver 2008, pour avoir partagé avec moi ses résultats, entre autres au sujet de l'expression de PAPI chez le modèle murin présentant une inflammation systémique. Un autre merci particulier à Isabelle, Christine et Jean-Philippe, vos mémoires ont été pour moi un guide tout au long de ma rédaction, merci de votre générosité.

À l'achèvement de mes études, j'ai également une pensée pour tous les membres du département : étudiants, assistants, professeurs, secrétaires et personnels techniques qui ont participé à ma formation. Merci.

Je voudrais aussi remercier les professeurs Fernand-Pierre Gendron et Simon Labbé qui ont gentiment accepté de réviser ce mémoire. Ainsi que le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour m'avoir appuyé au travers d'une bourse d'études.

Finalement, je tiens à remercier mes parents, Marie-Hélène Sigouin et François Brouillard. Vos encouragements, votre soutien et votre présence m'ont toujours accompagné. Merci pour tout, y compris les petits plats et muffins faits maison !

En dernier lieu, merci à mon amie Lyn. Nos discussions, plus souvent par téléphone qu'en personne, m'ont apporté réconfort et divertissements. Merci de t'être si sincèrement intéressée à mon projet.

*Les amis sont des anges qui nous soulèvent
quand nos ailes n'arrivent plus à se rappeler
comment voler...*

Liste des références

Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH and Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol.Cell.Biol.* 13: 4: 2235-2246, 1993.

Balkwill F and Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature* 431: 7007: 405-406, 2004.

Beaulieu JF and Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem.J.* 280 (Pt 3): Pt 3: 599-608, 1991.

Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B and Schaffner W. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41: 2: 521-530, 1985.

Bosse T, Piaseckyj CM, Burghard E, Fialkovich JJ, Rajagopal S, Pu WT and Krasinski SD. Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine. *Mol.Cell.Biol.* 26: 23: 9060-9070, 2006.

Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER and Traber PG. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J.Biol.Chem.* 277: 35: 31909-31917, 2002.

Boudreau F, Zhu Y and Traber PG. Sucrase-isomaltase gene transcription requires the hepatocyte nuclear factor-1 (HNF-1) regulatory element and is regulated by the ratio of HNF-1 alpha to HNF-1 beta. *J.Biol.Chem.* 276: 34: 32122-32128, 2001.

Boulanger J, Vezina A, Mongrain S, Boudreau F, Perreault N, Auclair BA, Laine J, Asselin C and Rivard N. Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 280: 18: 18095-18107, 2005.

Carroccio A, Iovanna JL, Iacono G, Li Pani M, Montalto G, Cavataio F, Marasa L, Barthelme-Bialas S and Dagorn JC. Pancreatitis-associated protein in patients with celiac disease: serum levels and immunocytochemical localization in small intestine. *Digestion* 58: 2: 98-103, 1997.

Cash HL, Whitham CV and Hooper LV. Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr.Purif.* 48: 1: 151-159, 2006.

Chakraborty C, Vrontakis M, Molnar P, Schroedter IC, Katsumata N, Murphy LJ, Shiu RP and Friesen HG. Expression of pituitary peptide 23 in the rat uterus: regulation by estradiol. *Mol.Cell.Endocrinol.* 108: 1-2: 149-154, 1995.

Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G and Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol.Cell.Biol.* 19: 6: 4355-4365, 1999.

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ and Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J.Biol.Chem.* 274: 16: 10689-10692, 1999.

Christa L, Felin M, Morali O, Simon MT, Lasserre C, Brechot C and Seve AP.

The human HIP gene, overexpressed in primary liver cancer encodes for a C-type carbohydrate binding protein with lactose binding activity. FEBS Lett. 337: 1: 114-118, 1994.

Clevers H. At the crossroads of inflammation and cancer. Cell 118: 6: 671-674, 2004.

Closa D, Motoo Y and Iovanna JL. Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine. World J.Gastroenterol. 13: 2: 170-174, 2007.

Crosnier C, Stamataki D and Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. Nat.Rev.Genet. 7: 5: 349-359, 2006.

De Plaen IG, Qu XW, Wang H, Tan XD, Wang L, Han XB, Rozenfeld RA and Hsueh W. Endotoxin, but not platelet-activating factor, activates nuclear factor-kappaB and increases IkappaBalpha and IkappaBbeta turnover in enterocytes. Immunology 106: 4: 577-583, 2002.

Duplan L, Michel B, Boucraut J, Barthelémy S, Desplat-Jego S, Marin V, Gambarelli D, Bernard D, Berthezene P, Alescio-Lautier B and Verdier JM. Lithostathine and pancreatitis-associated protein are involved in the very early stages of Alzheimer's disease. Neurobiol.Aging 22: 1: 79-88, 2001.

Dusing MR, Florence EA and Wiginton DA. High-level activation by a duodenum-specific enhancer requires functional GATA binding sites. Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol. 284: 6: G1053-65, 2003.

Dusing MR and Wiginton DA. Epithelial lineages of the small intestine have unique patterns of GATA expression. J.Mol.Histol. 36: 1-2: 15-24, 2005.

Escaffit F, Boudreau F and Beaulieu JF. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J.Cell.Physiol.* 203: 1: 15-26, 2005.

Fang R, Olds LC, Santiago NA and Sibley E. GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 280: 1: G58-67, 2001.

Fawcett DW, Jensh RP and Bloom W. Bloom & Fawcett : histologie, l'essentiel. Paris: Maloine, 2002, p. 477.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 1: 182-205, 1998.

Fogh J, Fogh JM and Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 59: 1: 221-226, 1977.

Folch-Puy E, Granell S, Dagorn JC, Iovanna JL and Closa D. Pancreatitis-associated protein I suppresses NF-kappa B activation through a JAK/STAT-mediated mechanism in epithelial cells. *J.Immunol.* 176: 6: 3774-3779, 2006.

Galand G. Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications. *Comp.Biochem.Physiol.B.* 94: 1: 1-11, 1989.

Gao X, Sedgwick T, Shi YB and Evans T. Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Mol.Cell.Biol.* 18: 5: 2901-2911, 1998.

Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC and Srivastava D. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424: 6947: 443-447, 2003.

Gartner LP and Hiatt JL. Atlas en couleur d'histologie. Paris: Éd. Pradel, 2004, p. 397.

Gironella M, Iovanna JL, Sans M, Gil F, Penalva M, Closa D, Miquel R, Pique JM and Panes J. Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease. *Gut* 54: 9: 1244-1253, 2005.

Grassi G, Maccaroni P, Meyer R, Kaiser H, D'Ambrosio E, Pascale E, Grassi M, Kuhn A, Di Nardo P, Kandolf R and Kupper JH. Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis* 24: 10: 1625-1635, 2003.

Gregorieff A and Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 19: 8: 877-890, 2005.

Haffen K, Keding M and Simon-Assmann P. Mesenchyme-dependent differentiation of epithelial progenitor cells in the gut. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 6: 1: 14-23, 1987.

Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA and Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J.Cell Biol.* 101: 3: 838-851, 1985.

Hermiston ML, Wong MH and Gordon JI. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev.* 10: 8: 985-996, 1996.

Ho MR, Lou YC, Lin WC, Lyu PC and Chen C. (1)H, (13)C, and (15)N resonance assignments and secondary structure of human pancreatitis-associated protein (hPAP). *J.Biomol.NMR* 30: 3: 381-382, 2004.

Hocker M and Wiedenmann B. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 859: 160-174, 1998.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M and Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 6837: 599-603, 2001.

Iovanna J, Orelle B, Keim V and Dagorn JC. Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *J.Biol.Chem.* 266: 36: 24664-24669, 1991.

Iovanna JL, Keim V, Bosshard A, Orelle B, Frigerio JM, Dusetti N and Dagorn JC. PAP, a pancreatic secretory protein induced during acute pancreatitis, is expressed in rat intestine. *Am.J.Physiol.* 265: 4 Pt 1: G611-8, 1993.

- Kandil E, Lin YY, Bluth MH, Zhang H, Levi G and Zenilman ME.** Dexamethasone mediates protection against acute pancreatitis via upregulation of pancreatitis-associated proteins. *World J.Gastroenterol.* 12: 42: 6806-6811, 2006.
- Katsumata N, Chakraborty C, Myal Y, Schroedter IC, Murphy LJ, Shiu RP and Friesen HG.** Molecular cloning and expression of peptide 23, a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. *Endocrinology* 136: 4: 1332-1339, 1995.
- Keim V, Iovanna JL and Dagorn JC.** The acute phase reaction of the exocrine pancreas. Gene expression and synthesis of pancreatitis-associated proteins. *Digestion* 55: 2: 65-72, 1994.
- Keim V, Rohr G, Stockert HG and Haberich FJ.** An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion* 29: 4: 242-249, 1984.
- Kelley C, Blumberg H, Zon LI and Evans T.** GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development* 118: 3: 817-827, 1993.
- Ko LJ and Engel JD.** DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol.Cell.Biol.* 13: 7: 4011-4022, 1993.
- Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C and Leiden JM.** GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 11: 8: 1048-1060, 1997.
- Lasserre C, Christa L, Simon MT, Vernier P and Brechot C.** A novel gene (HIP) activated in human primary liver cancer. *Cancer Res.* 52: 18: 5089-5095, 1992.

Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE and Molkentin JD. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol.Cell.Biol.* 21: 21: 7460-7469, 2001.

Loser P, Jennings GS, Strauss M and Sandig V. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J.Virol.* 72: 1: 180-190, 1998.

Lu JR, McKinsey TA, Xu H, Wang DZ, Richardson JA and Olson EN. FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol.Cell.Biol.* 19: 6: 4495-4502, 1999.

Lussier CR, Babeu JP, Auclair BA, Perreault N and Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 294: 2: G418-28, 2008.

Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E and Gumucio DL. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J.Biol.Chem.* 277: 36: 33275-33283, 2002.

Malka D, Vasseur S, Bodeker H, Ortiz EM, Dusetti NJ, Verrando P, Dagorn JC and Iovanna JL. Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein 1 activation. *Gastroenterology* 119: 3: 816-828, 2000.

Masciotra L, Lechene de la Porte,P., Frigerio JM, Dusetti NJ, Dagorn JC and Iovanna JL. Immunocytochemical localization of pancreatitis-associated protein in human small intestine. *Dig.Dis.Sci.* 40: 3: 519-524, 1995.

Menard D and Beaulieu JF.

Human intestinal brush border membrane hydrolases. In:

Membrane physiopathology, edited by Bkaily G. Boston: Kluwer Acad. Publ., 1994, p. 319-341.

Menard D, Beaulieu JF, Boudreau F, Perreault N, Rivard N and Vachon PH.

Gastrointestinal tract. In: Cell signaling and growth factors in development from molecules to organogenesis., edited by Unsicker K and Krieglstein K. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, chapt. 20, p. 755-790.

Merika M and Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol.Cell.Biol.* 13: 7: 3999-4010, 1993.

Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J.Biol.Chem.* 275: 50: 38949-38952, 2000.

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA and Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 11: 8: 1061-1072, 1997.

Montgomery RK, Mulberg AE and Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. *Gastroenterology* 116: 3: 702-731, 1999.

Morrissey EE, Ip HS, Tang Z and Parmacek MS. GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J.Biol.Chem.* 272: 13: 8515-8524, 1997.

Motoo Y, Satomura Y, Mouri I, Mouri H, Ohtsubo K, Sakai J, Fujii T, Taga H, Yamaguchi Y, Watanabe H, Okai T and Sawabu N. Serum levels of pancreatitis-associated protein in digestive diseases with special reference to gastrointestinal cancers. *Dig.Dis.Sci.* 44: 6: 1142-1147, 1999.

Moucadel V, Soubeyran P, Vasseur S, Dusetti NJ, Dagorn JC and Iovanna JL. Cdx1 promotes cellular growth of epithelial intestinal cells through induction of the secretory protein PAP I. *Eur.J.Cell Biol.* 80: 2: 156-163, 2001.

Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, Birling MC, Holtmann B, Sendtner M, Iovanna JL and Henderson CE. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat.Cell Biol.* 2: 12: 906-914, 2000.

Oesterreicher TJ and Henning SJ. Rapid induction of GATA transcription factors in developing mouse intestine following glucocorticoid administration. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 286: 6: G947-53, 2004.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G and Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 6837: 603-606, 2001.

Oka T, Maillet M, Watt AJ, Schwartz RJ, Aronow BJ, Duncan SA and Molkentin JD. Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ.Res.* 98: 6: 837-845, 2006.

Oka T, Xu J and Molkentin JD. Re-employment of developmental transcription factors in adult heart disease. *Semin.Cell Dev.Biol.* 18: 1: 117-131, 2007.

Omichinski JG, Clore GM, Schaad O, Felsenfeld G, Trainor C, Appella E, Stahl SJ and Gronenborn AM. NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* 261: 5120: 438-446, 1993.

Omichinski JG, Trainor C, Evans T, Gronenborn AM, Clore GM and Felsenfeld G. A small single-"finger" peptide from the erythroid transcription factor GATA-1 binds specifically to DNA as a zinc or iron complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90: 5: 1676-1680, 1993.

Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC and Iovanna JL. Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *J.Clin.Invest.* 90: 6: 2284-2291, 1992.

Ortiz EM, Dusetti NJ, Vasseur S, Malka D, Bodeker H, Dagorn JC and Iovanna JL. The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2J cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology* 114: 4: 808-816, 1998.

Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ and Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16: 8: 948-958, 2002.

- Pageot LP, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P and Beaulieu JF.** Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc.Res.Tech.* 49: 4: 394-406, 2000.
- Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R and Ruskoaho H.** GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc.Res.* 63: 2: 196-207, 2004.
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J and Zweibaum A.** Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47: 323-330, 1983.
- Podolsky DK.** Inflammatory bowel disease. *N.Engl.J.Med.* 347: 6: 417-429, 2002.
- Porter EM, Bevins CL, Ghosh D and Ganz T.** The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol.Life Sci.* 59: 1: 156-170, 2002.
- Quaroni A, Wands J, Trelstad RL and Isselbacher KJ.** Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J.Cell Biol.* 80: 2: 248-265, 1979.
- Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J and Sartor RB.** Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect.Immun.* 69: 4: 2277-2285, 2001.
- Rechreche H, Montalto G, Mallo GV, Vasseur S, Marasa L, Soubeyran P, Dagorn JC and Iovanna JL.** pap, reg Ialpha and reg Ibeta mRNAs are concomitantly up-regulated during human colorectal carcinogenesis. *Int.J.Cancer* 81: 5: 688-694, 1999.

- Rousset M.** The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68: 9: 1035-1040, 1986.
- Sambrook J and Russell DW.** Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sancho E, Batlle E and Clevers H.** Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 20: 695-723, 2004.
- Sansonetti A, Romeo H, Berthezene P, Scacchi P, Dusetti N, Keim V, Dagorn JC and Iovanna JL.** Developmental, nutritional, and hormonal regulation of the pancreatitis-associated protein I and III gene expression in the rat small intestine. *Scand.J.Gastroenterol.* 30: 7: 664-669, 1995.
- Sauer B.** Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol.* 225: 890-900, 1993.
- Scaldaferri F and Fiocchi C.** Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J.Dig.Dis.* 8: 4: 171-178, 2007.
- Scoazec JY.** Épithéliums digestifs: aspects cellulaires et moléculaires. In: , edited by Cadiot G, Galmiche JP, Matuchansky C and Mignon M. Paris: Ellipses, 2005, p. 8-18.
- Serio G and Zampatti C.** Predominant Paneth cell differentiation in a colonic adenocarcinoma. *Histopathology* 36: 2: 187-188, 2000.
- Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G and Kedinger M.** In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol.Toxicol.* 23: 4: 241-256, 2007.
- Soudais C, Bielinska M, Heikinheimo M, MacArthur CA, Narita N, Saffitz JE, Simon MC, Leiden JM and Wilson DB.** Targeted mutagenesis of the transcription

factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development* 121: 11: 3877-3888, 1995.

Stappenbeck TS, Wong MH, Saam JR, Mysorekar IU and Gordon JI. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10: 6: 702-709, 1998.

Stegmann A, Hansen M, Wang Y, Larsen JB, Lund LR, Ritte L, Nicholson JK, Quistorff B, Simon-Assmann P, Troelsen JT and Olsen J. Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol.Genomics* 27: 2: 141-155, 2006.

Suh E and Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol.Cell.Biol.* 16: 2: 619-625, 1996.

Svensson EC, Tufts RL, Polk CE and Leiden JM. Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 3: 956-961, 1999.

Symonds DA. Paneth cell metaplasia in diseases of the colon and rectum. *Arch.Pathol.* 97: 6: 343-347, 1974.

Tachibana K, Marquardt H, Yokoya S and Friesen HG. Growth hormone-releasing hormone stimulates and somatostatin inhibits the release of a novel protein by cultured rat pituitary cells. *Mol.Endocrinol.* 2: 10: 973-978, 1988.

Tevosian SG, Deconinck AE, Cantor AB, Rieff HI, Fujiwara Y, Corfas G and Orkin SH. FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger

proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 3: 950-955, 1999.

Tomita-Mitchell A, Maslen CL, Morris CD, Garg V and Goldmuntz E. GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease. *J.Med.Genet.* 44: 12: 779-783, 2007.

Tortora GJ, Grabowski SR, Imbach A and Ferron A. *Principes d'anatomie et de physiologie.* Saint-Laurent: Erpi, 2001, p. 1121.

Turgeon N, Rousseau D, Roy E and Asselin C. GATA-4 modulates C/EBP-dependent transcriptional activation of acute phase protein genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 370 : 2: 371-375, 2008.

Vachon PH and Beaulieu JF. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103: 2: 414-423, 1992.

van der Sluis M, Melis MH, Jonckheere N, Ducourouble MP, Buller HA, Renes I, Einerhand AW and Van Seuningen I. The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 325: 3: 952-960, 2004.

van Wering HM, Bosse T, Musters A, de Jong E, de Jong N, Hogen Esch CE, Boudreau F, Swain GP, Dowling LN, Montgomery RK, Grand RJ and Krasinski SD. Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 287: 4: G899-909, 2004.

Xia Y, McMillin JB, Lewis A, Moore M, Zhu WG, Williams RS and Kellems RE. Electrical stimulation of neonatal cardiac myocytes activates the NFAT3 and GATA4

pathways and up-regulates the adenylosuccinate synthetase 1 gene. J.Biol.Chem. 275: 3: 1855-1863, 2000.

Xie MJ, Motoo Y, Iovanna JL, Su SB, Ohtsubo K, Matsubara F and Sawabu N. Overexpression of pancreatitis-associated protein (PAP) in human pancreatic ductal adenocarcinoma. Dig.Dis.Sci. 48: 3: 459-464, 2003.

Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ and Zoghbi HY. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. Science 294: 5549: 2155-2158, 2001.

Zweibaum A and Chantret I.

Human colon carcinoma cell lines as in vitro models for the study of intestinal cell differentiation. In: Adaptation and development of gastrointestinal functions, edited by Smith MW and Sepulveda FV. Manchester: Manchester University Press, 1989, p. 103-112.